Aus der Abteilung für Physikalische Biologie
des Max-Planck-Institutes für Virusforschung in Tübingen

Monoklonale Antikörper gegen Oberflächenkomponenten neuronaler Zellen

- Ein Hilfsmittel bei Untersuchungen zur Entwicklung des Nervensystems -

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
SIGRID HENKE-FAHLE, geb. Henke
aus Etelsen

1983

Aus der Abteilung für Physikalische Biologie
des Max-Planck-Institutes für Virusforschung in Tübingen

Monoklonale Antikörper gegen Oberflächenkomponenten neuronaler Zellen

- Ein Hilfsmittel bei Untersuchungen zur Entwicklung des Nervensystems -

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
SIGRID HENKE-FAHLE, geb. Henke
aus Etelsen

1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan:	Professor Dr. W. Frommhold
1. Berichterstatter:	Professor Dr. P. A. Berg
2. Berichterstatter:	Professor Dr. J. Dichgans

Druck: Zeeb-Druck, Tübingen 7 (Hagelloch)

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
2.	ABKÜRZUNGEN	11
3.	MATERIAL UND METHODEN	13
3.1.	Kultivierung der Myelom- und Hybridom-Zellinien	13
3.1.1.	Kulturmedien	13
3.1.2.	Myelomzellen	13
3.1.3.	Durchführung der Zellfusion	14
3.1.4.	Makrokulturen	16
3.1.5.	Einfrieren der Zellen und Klonierung	17
3.1.6.	Kultivierung der Hybridom-Zellen	18
3.1.7	Gewinnung von antikörperhaltigem Ascites	18
3.2.	Antigenherstellung	19
3.2.1.	Retinazellmembranen	19
3.2.2.	Tectumzellmembranen	21
3.3.	Immunologische Techniken	21
3.3.1.	Immunisierung von Mäusen	22
3.3.2.	Darstellung von Antikörperreagentien	22
3.3.2.1.	Kaninchen-Anti-Maus-Fab-Antikörper (KAM-Fab)	22
3.3.3.2.	Jodierung von Proteinen	22
3.3.3.	Immunologische Nachweismethoden	24
3.3.3.1.	Radioimmuntest	24
3.3.3.2.	Ouchterlony-Doppelimmundiffusion	26
3.3.3.3.	Bestimmung der Immunglobulin-Konzentration	27

		Seite
3.3.4.	Indirekte Immunfluoreszenz	28
3.3.4.1.	Immunfluoreszenz an Einzelzellkulturen	28
3.3.4.1.1.	Herstellung von Zellpräparaten mit Trypsin	28
3.3.4.1.2.	Herstellung von Zellpräparaten mit Papain	29
3.3.4.1.3.	Anfärbung und Photographie	29
3.3.4.2.	Indirekte Immunfluoreszenz an Gefrierschnitten	31
3.3.5.	Nachweis von Glykolipidantigenen	32
3.3.5.1.	Isolierung von Gangliosiden mit Tetrahydrofuran	32
3.3.5.2.	Dünnschichtchromatographie von Gangliosiden	33
3.3.5.3.	Antigennachweis auf Dünnschichtchromatographieplatten	34
3.4.	Elektrophorese und analytische Nachweismethoden	35
3.5.	Explantatkulturen	36
3.5.1.	Herstellung von Explantaten	36
3.5.2.	Mikroskopische Untersuchung und Photographie	38
3.5.3.	Zeitrafferaufnahmen	38
3.6.	Chemikalien	38
4.	ERGEBNISSE	40
4.1.	Darstellung der Antigene	40
4.2.	Etablierung der Zellinien	41
4.2.1.	Immunantwort	41
4.2.2.	Ergebnisse auf der Ebene der Zellinien	43

Seite

4.3. Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen embryonale Nervenzellen des Hühnerembryos 49

4.3.1. Nervensystemspezifität 49

4.3.2. Monoklonale Antikörper mit Spezifität für Glykolipidantigene 50

4.3.2.1. Nachweis des Q211-Ag in Zellkulturen 52

4.3.2.2. Altersabhängigkeit der Q211-Ag-Nachweisbarkeit 54

4.3.2.3. Lokalisierung des Q211-Ag in Gefrierschnitten 54

4.3.2.4. Speziesspezifität des Q211-Ag 56

4.3.2.5. Biochemische Charakterisierung des Q211-Ag 56

4.3.3. Antikörper mit funktionsinhibierender Wirkung 60

4.3.3.1. Charakterisierung des T61/3-Ak in der Immunfluoreszenz 60

4.3.3.2. Einfluß des T61/3-Ak auf das Auswachsen von Neuriten 63

5. DISKUSSION 69

6. ZUSAMMENFASSUNG 84

7. LITERATUR 85

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547617_0013

1. E I N L E I T U N G

Das zentrale Nervensystem, das beim Menschen aus etwa 10^{10} Neuronen aufgebaut ist, die jeweils Informationen von 1000 Partnerzellen erhalten und auch auf ebensoviele übertragen, macht wegen seiner komplexen Struktur die Frage nach seiner Entstehung während der Embryogenese für den entwicklungsbiologisch Interessierten besonders reizvoll. Hier müssen, im Gegensatz zu anderen Organen, Kontakte über lange Distanzen aufgenommen und erhalten werden, die sehr spezifisch sind bezüglich der Zelltypen, die miteinander in Wechselwirkung treten und der Position der Zellen innerhalb eines bestimmten Areals.

Bei der Ausbildung aller laminierten neuralen Systeme (z.B. Großhirnrinde, Netzhaut) der Wirbeltiere laufen die folgenden Prozesse in räumlich-zeitlicher Ordnung ab: Aus einer begrenzten Anzahl von neuroepithelialen Vorläuferzellen in der das Neuralrohr umgebenden Ventrikularzone entstehen durch zahlreiche Zellteilungen postmitotische Zellen, die das Neuroepithel verlassen, nach außen wandern und dort die Mantelschicht bilden. Bei ihrer Wanderung orientieren sie sich wahrscheinlich an radiären Gliafortsätzen (Rakic, 1971), wie es für den cerebellären Cortex und den Neocortex von Primaten gezeigt wurden. Die Laminae des Neocortex entstehen in einer Innen-Außen-Sequenz (bezogen auf die Ventrikularzone), so daß später nachkommende Neuronen durch bereits existierende Schichten hindurchwandern müssen (Rakic, 1974). Im Anschluß an die Migration aggregieren die

Zellen selektiv, um z.B. die Anlage einer corticalen Lamina im ZNS oder eines Ganglions im peripheren Nervensystem zu bilden, ein Vorgang, der seit Holtfreter (1939) als eines der weitestverbreiteten entwicklungsbiologischen Phänomene bekannt ist. Es handelt sich dabei um die Tendenz von Zellen gleicher Art oder gemeinsamen embryonalen Ursprungs, sich auszusortieren und, wie im Falle des oben beschriebenen Prozesses, sich an ihren Nachbarn auszurichten. Diese Eigenschaft ist sogar mit dissoziierten Zellen in vitro nachzuweisen (DeLong, 1970), ein Hinweis darauf, daß die Zellen auf ihren Oberflächen Determinanten tragen, die sie andere Zellen mit ähnlichen Eigenschaften erkennen lassen. Eine Reihe solcher zellulärer Liganden konnte identifiziert und isoliert werden (Moscona, 1974; Barondes, 1976).

Die Zytodifferenzierung der Neuronen mit der Ausformung von Dendriten und Axonen stellt den nächsten Schritt dar in der Entwicklung des Nervensystems. Das morphologische Erscheinungsbild einer speziellen Nervenzelle wird bestimmt durch genetische Faktoren (Levinthal et al., 1976) und Einflüsse aus der direkten Umgebung, wie zum Beispiel der Anwesenheit von Afferenzen. So wird für den Fall des cerebellären Cortex von Rakic (1973) darauf hingewiesen, daß die oberflächlich gelegenen Sternzellen ihr dendritisches Verzweigungsmuster erst dann ausbilden, wenn die sie später umgebenden Parallelfasern angelegt werden, die ihren überwiegenden afferenten Input darstellen.

Das Längenwachstum von neuronalen Fortsätzen erfolgt zunächst distal an den Dendritenenden bzw. den Wachstumskegeln der Axone (Bray, 1970). Dabei wachsen die Axone zum

Teil über lange Distanzen, bis sie auf ihr Zielgebiet treffen und dort synaptische Verbindungen mit anderen Zellen eingehen. Die grundlegenden Fragen, die im Zusammenhang mit diesen Prozessen hauptsächlich gestellt werden, betreffen einmal die Mechanismen, die es den Axonen erlauben, ihr Ziel über weite Strecken hinweg zu finden und zweitens die Faktoren, die ihnen, dort angekommen, ermöglichen, ganz bestimmte Zellen innerhalb eines Areals als Partner auszusuchen. Diese Probleme wurden besonders intensiv am optischen System niederer Wirbeltiere untersucht, und wir wählten wegen der bereits vorhandenen, allerdings noch sehr unvollständigen Daten, der leichten präparativen Zugänglichkeit und der verhältnismäßig großen Materialmenge das optische System des Hühnchens, um Antworten auf den zweiten Teil des oben skizzierten Fragenkomplexes zu finden.

Bei Fischen, Amphibien und Vögeln wird die Abbildung der Umwelt von der Retina auf das Mittelhirndach (oder optische Tectum) übertragen, der ersten und wichtigsten Schaltstelle, die die optischen Trakte nach der vollständigen Überkreuzung der Nerven im Chiasma erreichen. Die Projektion auf das Tectum ist retinotopisch organisiert, bei Reizung benachbarter Orte auf der Retina können Signale von ebenfalls benachbarten Gebieten des Tectums abgeleitet werden (Clarke und Whitteridge, 1976). Korrespondierende Orte ließen sich auch ermitteln durch örtliche Verletzung der Retina und Verfolgung des Verlaufs degenerierender Fasern (McGill et al., 1966). Weiterhin konnte der Faserverlauf dargestellt werden durch Injektion von Substanzen, die von der Retina anterograd zum optischen Tectum (Crossland et al., 1974;

Fujisawa et al., 1981) und retrograd in umgekehrter Richtung (LaVail und LaVail, 1974) von den Ganglienzellaxonen transportiert werden. Die Abbildung der Retina auf das optische Tectum ließ sich so analog zu Fisch und Amphibien folgendermaßen rekonstruieren: Die nasale Retina ist am caudalen (posterioren) Tectum und die temporale am rostralen (anterioren) repräsentiert; die dorsalen Retinafasern laufen zum ventralen Teil des Tectums und die ventralen zum dorsalen.

Die Frage, welche Mechanismen der Ausbildung der retinotopen Organisation zugrundeliegen, kann noch nicht schlüssig beantwortet werden. Horder und Martin (1978) und Rager (1980) vertreten die Meinung, daß die bereits im optischen Nerv angelegte retinotope Ordnung der Fasern bewirke, daß sie geordnet ihr Zielgebiet erreichten und dort nur noch unspezifische Wechselwirkungen zwischen einwachsenden Axonen und tectalen Zellen nötig seien. Diese könnten z.B. darin bestehen, daß die als erste ankommenden Fasern (die aus der zentralen Region der Retina stammen wegen des von zentral nach peripher ablaufenden Reifungsprozesses der Retina) so lange über das Tectum wachsen, bis sie auf die Dendritenbäume von reifen Neuronen stoßen, mit denen sie dann Kontakt aufnehmen. Da diese Zellreifung am weitesten fortgeschritten ist in der Zentralregion des Tectums (Rager, 1980), könnten deswegen dort die ersten synaptischen Verknüpfungen mit optischen Axonen ausgebildet werden. Die Entstehung des Projektionsmusters ließe sich so durch vorgegebene räumliche Ordnung und räumlich-zeitliche Reifungsgradienten erklären.

Im optischen Nerven von Fischen (Scholes, 1979) und des Huhns (Thanos, 1982) konnte tatsächlich eine retinotope

Anordnung nachgewiesen werden, und auch bei Amphibien gibt es eine gewisse Aussortierung der Fasern vor Erreichen des Tectums in einen medialen und einen lateralen Ast der optischen Trakte (Jacobson, 1960; Attardi und Sperry, 1963; Scalia und Fite, 1974; Fujisawa et al., 1981).

Gegen eine strenge retinotope Ordnung im optischen Nerven sprechen jedoch Beobachtungen über den Verlauf von einzelnen Fasern bei der Katze (Horton et al., 1979) und beim Frosch (Fawcett, 1980), die mit Meerrettich-Peroxidase markiert worden waren. In der Retina und am Anfang des optischen Nerven benachbarte Fasern bleiben im weiteren Verlauf nicht zusammen.

Eine Vielzahl von in vivo und in vitro durchgeführten Experimenten spricht ebenfalls nicht dafür, daß die vorstehend beschriebenen Mechanismen ausreichen, um die Ausbildung der spezifischen Projektion zu erklären. Sperry`s (1943, 1944) klassisches Experiment, in dem er Fröschen die Augen entnommen und um 180° rotiert wieder implantiert hatte, zeigte aus dem Verhalten der Frösche nach Regeneration des Nerven, daß die regenerierenden Fasern mit den Teilen des Tectums Verbindung aufgenommen haben mußten, mit denen sie ursprünglich verbunden gewesen waren, und führte ihn zur Formulierung einer Chemoaffinitätshypothese (1950, 1963). Hiernach erhalten die Nervenzellen eine ihrer Position entsprechende chemische Markierung, die es ihnen ermöglicht, eine komplementäre oder gleiche Markierung auf den Zielzellen zu erkennen. Später durchgeführte Versuche, bei denen Teile des Tectums von Fröschen und Fischen herausgeschnitten, gedreht oder auf einen anderen Teil des Tectums über-

tragen wurden (Levine und Jacobson, 1974; Jacobson und Levine, 1975; Sharma und Gaze, 1971; Yoon, 1977), unterstützten diese Theorie und widersprachen der "Zeit"-Erklärung: als Ziel der retinalen Fasern behielten die Tectumstücke jeweils die ihrer ursprünglichen Position entsprechenden Eigenschaften (positional markers: Levine und Jacobson, 1974).

Falls Sperry`s Hypothese tatsächlich zutreffend und jedes Neuron individuell durch eine Substanz markiert wäre, müßte eine sehr große Anzahl verschiedener Moleküle gefordert werden. Die genetische Kapazität scheint jedoch dafür kaum ausreichend zu sein, außerdem wäre eine hochspezifische Positionsmarkierung von Axon und Zielzelle allein nicht ausreichend, um zu erklären, wie Axone die Zielzellen ohne weites Umherirren auf direktem Weg ansteuern. Die Hypothese ist auch nicht vollständig in Einklang zu bringen mit Kompressions- und Expansionsphänomenen der retinalen Karte, die bei den oben beschriebenen Versuchen zu beobachten sind.

Die Nachteile dieser Hypothese führten so zur Formulierung von modifizierten Theorien, in denen zur Positionsmarkierung nur sehr wenige qualitativ verschiedene Substanzen gefordert werden, die in gradierter Verteilung auf Retina und Tectum vorkommen. Die Retinaaxone bevorzugen dann entsprechend ihrer Position im Gradientensystem Zellen im tectalen Gradientensystem, so daß es zu einer regionalen Spezifität der Verschaltung kommt (Cowan, 1978). Nach einer neuen Theorie (Gierer, 1981) würde für jede Dimension innerhalb des Ziel- und des projizierenden Gewebes eine gradiert verteilte Substanz ausreichen, um viele der *in vivo* beobachte-

ten Phänomene zu erklären.

Für einen Gradientenmechanismus sprechen auch etliche der in vitro Experimente, die mit diesem System duchgeführt wurden. Barbera et al. (1973, 1975) zeigten, daß durch Dissoziierung neuraler Retina gewonnene Einzelzellen deutliche Präferenzen zeigen bei der Adhäsion an tectale Hälften; dorsale Retinazellen bevorzugen die ventralen Tectumhälften, während ventrale Retinazellen sich präferentiell an dorsale Hälften anlagern. Ähnliche Ergebnisse wurden erhalten, wenn Monolayer aus tectalen Zellen anstelle der Tectumhälften eingesetzt wurden (Gottlieb und Arington, 1979). Ein Adhäsionsgradient wurde auch innerhalb der Retina gefunden (Gottlieb et al., 1976), Zellen aus der extrem dorsalen Region der Retina adhärierten bevorzugt (schneller) an einen Monolayer aus Zellen der ganz ventralen Retina als an Zellen aus mehr dorsalen Bereichen. Für die ventralen Zellen wurde das entgegengesetzte Verhalten nachgewiesen.

Diese Versuche haben den Nachteil, daß sie die Eigenschaften von Zellperikarya beschreiben, die aber im Tier selbst zum Teil nicht miteinander in Kontakt treten. Von Bonhoeffer und Huf (1980) wurde deshalb ein System entwickelt, in dem die Wechselwirkung der Axone und ihrer Wachstumskegel mit Zellmonolayern als Substrat untersucht werden kann. Gezeigt wurde, daß die Retinaaxone bevorzugt an Tectumzellen entlangwachsen, wenn ihnen Retina- und Tectumzellen zur Wahl gestellt werden. Im gleichen Versuchstyp ergab sich zusätzlich, daß die Axone, abhängig von ihrer Ursprungsposition in der Retina, verschiedene Erkennungseigenschaften aufweisen (Bonhoeffer und Huf, 1982). Axone

aus der temporalen Hälfte haben die Fähigkeit, zwischen Tectumzellen aus verschiedenen Bereichen entlang der rostro-caudalen (anterior-posterior) Achse zu differenzieren. Die Eigenschaften der tectalen Zellen, die von diesen Retinaaxonen erkannt werden, weisen eine gradierte Verteilung entlang der antero-posterioren Achse auf.

Die in vitro-Experimente, die auf eine wesentliche Bedeutung der Beschaffenheit der Zelloberfläche bei der Ausbildung der retino-tectalen Projektion des Hühnchens hinweisen, legen nahe, aus den Zellmembranen Substanzen zu isolieren, die den "Erkennungsmolekülen" entspechen könnten. So berichten z.B. Merrell et al. (1975) von der Anreicherung eines Faktors aus Retinamembranen, der sowohl die Aggregation von homotypischen (Retina) als auch heterotypischen (Tectum) Zellen hemmt, während ein anderer Faktor aus Tectummembranen nur die Aggregation von homotypischen Zellen hemmt. Welche Bedeutung diesen Faktoren wirklich bei den Erkennungsmechanismen zwischen retinalen Wachstumskegeln und tectalen Zellen zukommt, ist noch unbekannt.

Eine andere Möglichkeit, die Zusammensetzung der Zellmembran und die an den beschriebenen Prozessen beteiligten Komponenten kennenzulernen, wurde in dieser Arbeit gewählt. Es wurde versucht, Antikörper gegen Oberflächenstrukturen embryonaler Zellen des optischen Systems des Hühnchens zu gewinnen, um dann damit eventuell durch Analyse der von ihnen erkannten Antigene die Zellmembran zu charakterisieren und - als entfernteres Ziel - in in vitro-Tests zu untersuchen, ob mit ihnen zelluläre Prozesse, wie Wachstum von Axonen und Zielfindung beeinflußt werden können. Nach Expe-

rimenten mit polyklonalen Antiseren, die sich als nicht sehr erfolgreich erwiesen, wählten wir Produktion und Einsatz von monoklonalen Antikörpern als aussichtsreicheren Ansatz.

Bei der Herstellung von monoklonalen Antikörpern, einer von Köhler und Milstein (1975) entwickelten Technik, werden Milzzellen eines immunisierten Tieres durch Fusion mit Myelomzellen "unsterblich" gemacht und anschließend in so großer Verdünnung in Kulturen ausgesät, daß sich in jeder Kulturschale nur eine antikörperproduzierende Zelle befindet, aus der dann Tochterzellen hervorgehen, die alle denselben "monoklonalen" Antikörper sezernieren. Auf diese Weise können große Mengen verschiedener monoklonaler Antikörpermoleküle gewonnen werden.

Diese Methode hat seit ihrer Einführung ein große Verbreitung gefunden. Auf dem Gebiet der Neurobiologie wurde z.B. bei Invertebraten (Zipser und McKay, 1981) eine Reihe von Antikörpern gefunden, die ganz spezifisch einzelne Neuronen, Neuronenpaare oder -gruppen mit definierter Funktion erkennen. Bei den Vertebraten wird von verschiedenen Autoren eine Anzahl monoklonaler Antikörper beschrieben, unter anderem solche, die gegen adulte Rattenretina gerichtet sind (Barnstable, 1980). Bestimmte monoklonale Antikörper erkennen spezifisch Oligodendrozyten (Sommer und Schachner, 1981; Ranscht et al., 1980), andere ausschließlich Neuronen aus dem peripheren Nervensystem (Vulliamy et al., 1981), wieder andere nur solche des zentralen Nervensystems (Cohen und Selvendran, 1981). Mit Hilfe monoklonaler Antikörper wurde ein für Neuronen spezifisches Glykoprotein (Hirn et al., 1981) oder Glykolipid (Eisenbarth et al., 1979) gefunden,

und innerhalb der embryonalen Hühnerretina wurde sogar die gradierte Verteilung einer noch nicht genauer charakterisierten Substanz nachgewiesen (Trisler et al., 1981).

In der vorliegenden Arbeit werden Techniken dargestellt, die wir als Grundlage entwickelten und benutzten, um eine inzwischen weit größere Anzahl Antikörper-produzierender Zellinien als die hier beschriebenen zu etablieren und zu charakterisieren. Die vorgestellten Ergebnisse repräsentieren eine Auswahl der Ergebnisse, die aus anfänglichen Fusionsexperimenten gewonnen wurden. Die aufgeführten monoklonalen Antikörper sind in ihrer Spezifität gegen Zellen des embryonalen Hühnernervensystems gerichtet. Sie werden von Hybridomzellen hergestellt, die wir nach Fusionen von Splenocyten aus Mäusen, die zuvor mit Zellen oder Zellmembranen aus dem optischen System des Hühnerembryos immunisiert worden waren, mit Mausmyelomzellen erhielten. Mit der Technik der indirekten Immunfluoreszenz an Gewebeschnitten und Einzelzellpräparationen wurden sie auf ihre Nervensystemspezifität untersucht. Zwei von ihnen werden dann genauer charakterisiert. Das Auftreten der zugehörigen Antigene zu verschiedenen Zeiten während der Embryonalentwicklung der Retina, ihre Verteilung in verschiedenen Gehirngebieten und ihre Spezifität für das zentrale Nervensystem wurden untersucht. Im weiteren werden die biochemische Charakterisierung eines der Antigene beschrieben und die *in vitro*-Tests, die wir durchführten, um solche Antikörper zu finden, die einen Einfluß auf das Wachstum von Axonen haben.

2. A B K Ü R Z U N G E N

Ag	Antigen
Ak	Antikörper
ConA	Concanavalin A
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase I	Desoxyribonuklease I
DPBS	Dulbecco`s phosphatgepufferte Saline
EGTA	Äthylenglycol-bis-(ß-Aminoäthyl-äther)N,N`-Tetraessigsäure
Fab γ	"Fragment Antibody" der IgG-Fraktion
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
HAT	Hypoxanthin-,Aminopterin- und Thymidin enthaltende Selektionsmedien
HPTLC	High-Performance Thin-Layer Chromatography
IE	Internationale Einheit
IFA	Inkomplettes Freund`s Adjuvans
IgG	Immunglobulin-G
IgM	Immunglobulin-M
KAM Fab	Kaninchen-Anti-Maus-Fab-Antikörper
KP	Kaliumphosphatpuffer
NaP	Natriumphosphatpuffer
NS-1	Myelomzellinie P3-NS1/1-Ag4-1
65/3	Myelomzellinie P3-X63-Ag8-65/3
PEG	Polyäthylenglycol
PVC	Polyvinylchlorid
RITC	Rhodaminisothiocyanat
RNase	Ribonuklease
RNS	Ribonukleinsäure

RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute Medium 1640
RSA	Rinderserumalbumin
SDS	Na-Dodecylsulfat
THF	Tetrahydrofuran
Tris	Tris(hydroxymethyl-)aminomethan
UpM	Umdrehungen pro Minute

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Kultivierung der Myelom- und Hybridom-Zellinien

3.1.1. Kulturmedien

RPMI 1640, Roswell Park Memorial Institute Medium, wurde von Flow Laboratories bezogen und unter Zusatz von 20 % hitzeinaktiviertem FKS (Gibco oder Seromed), 10 mM Natriumpyruvat, 20 µM ß-Mercaptoäthanol, 40 mM L-Glutamin und je 100 IE Penicillin und Streptomycin verwendet.

HAT-RPMI wurde unter Zusatz von 19.9 mg Hypoxanthin, 42mg Thymidin und 0.27 mg Aminopterin zu 1000 ml RPMI 1640 zur Selektion von Hybridzellen nach Littlefield (1964) verwendet.

Alle Medien wurden vor ihrer Verwendung bei 4 % CO_2 und 37°C im Brutschrank vorinkubiert.

3.1.2. Myelomzellen

Die Mausmyelomzellinie P3-NS1/1-Ag4-1 (Köhler et al., 1976) wurde uns freundlicherweise von Dr. Milstein zur Verfügung gestellt, die Zellinie P3-X63-Ag 8-65/3 (Kearney et al., 1979) von Dr. G.Hämmerling. Beide Zellinien wurden in RPMI 1640 Medium unter Zusatz von 20 µg/ml 8-Azaguanin selektioniert und dann in RPMI 1640 Medium bei einer Zelldichte von 10^5 bis 10^6 Zellen pro ml in 10 ml Kulturen in Petrischalen (bakteriologisch; Greiner, Nürtingen) in einem Brutschrank (Forma Scientific 3156, Marietta, Ohio) bei 37°C, 4 % CO_2 in feuchter Atmosphäre gehalten (weiter als CO_2-Brutschrank bezeichnet). Sie werden fortan als NS-1 bzw. 65/3 bezeichnet.

3.1.3. Durchführung der Zellfusion

Mäuse, deren Seren im Radioimmuntest ein positives Ergebnis gezeigt hatten, wurden das letzte Mal intravenös immunisiert wie beschrieben (s. 3.3.1.). Die Mäuse wurden 3 1/2 Tage danach mit Äther anaesthesiert und durch Herzpunktion ausgeblutet. Die Milz wurde unter sterilen Bedingungen entnommen, mit 5 ml Dulbecco`s Phosphat-gepufferter Saline (DPBS; Dulbecco und Vogt, 1954) gewaschen, in eine Petrischale transferiert und in 5 ml DPBS mit einer Schere zerkleinert. Die Milzzellen wurden durch mehrfaches Pipettieren der Gewebestücke durch eine Pasteur-Pipette extrahiert. Grobe Gewebeteile wurden danach durch 1xg Sedimentation über 10 ml DPBS abgetrennt. Aus dem Überstand wurden die Milzzellen (eine Mischung von hauptsächlich Lymphocyten und Erythrocyten) durch 5-minütige Zentrifugation bei 1000 UpM in einer Christ-Minifuge 2 (Heraeus-Christ) gesammelt und in 5 ml frischem DPBS bei Raumtemperatur suspendiert.

Die Myelomzellen der Linien NS-1 und 65/3 wurden aus 10 Petrischalen geerntet, gemischt und durch 5-minütige Zentrifugation in der Minifuge bei 1000 UpM sedimentiert. Der Überstand wurde sehr sorgfältig entfernt und die Zellen in 5ml DPBS suspendiert.

Die Zellfusion erfolgte nach einer von Pontecorvo (1975) entwickelten und von Hämmerling (1977) modifizierten Methode, wobei bei verschiedenen Fusionen noch zusätzliche Änderungen vorgenommen wurden.

Es wurden 10^8 Milzzellen und $2x10^7$ Myelomzellen zur Fusion in einem Gesamtvolumen von nicht mehr als 5 ml gemischt

und sofort in einer Christ-Minifuge 2 fünf Minuten bei 1000 UpM und Raumtemperatur abzentrifugiert. Im Falle der 65/3 Zellen wurde die Anzahl der Myelomzellen im Ansatz auf $5x10^7$ erhöht. Anschließend wurde der Überstand sorgfältig abgesaugt, und zu den sedimentierten Zellen wurden mit einer 1ml Plastik-Pipette (Greiner, Nürtingen) vorsichtig 0.5 ml PEG-Lösung gegeben, wobei sehr behutsam mit der Pipettenspitze umgerührt wurde (PEG-Lösung: 14 ml DPBS mit 15 % (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO) wurden mit 10 g Polyäthylenglykol 4000 gemischt, das durch 20-minütiges Autoklavieren zuvor verflüssigt worden war; Saumweber, 1980). Die Fusionsmischung wurde 70 sec bei 37°C im Wasserbad inkubiert und sofort danach durch tropfenweise Zugabe von 10 ml auf 37°C vorgewärmten DPBS ausverdünnt. Die ersten 5 ml wurden langsam innerhalb 2 min dazugegeben, die restlichen 5 ml schneller in einer zusätzlichen Minute. Dabei wurde das Röhrchen ständig leicht geschwenkt, um die schwere PEG-Lösung mit dem DPBS zu durchmischen. Die Zellaggregate wurden 5 min bei 1000 UpM sedimentiert, der Überstand wurde sorgfältig abgesaugt, und die Zellen vorsichtig in 9.5 ml HAT-RPMI suspendiert. Mit einer 1 ml Plastik-Pipette wurde die Zellsuspension in 50 µl Tropfen pro Vertiefung auf 2 Mikrotiter-Platten verteilt (F-Form; Greiner, Nürtingen; 96 Vertiefungen mit je 150 µl HAT-RPMI). Die Zellen wurden im CO_2-Brutschrank inkubiert, und nach 5 Tagen wurden 100 µl Medium gegen 100 µl frisches HAT-RPMI ausgetauscht.

Als zusätzliche Modifikation wurden bei einigen Fusionen nach Fazekas de St. Groth und Scheidegger (1980) den fusionierten Zellen peritoneale Makrophagen zugesetzt, die sowohl

als Fütterzellen dienen als auch dazu beitragen, Trümmer der nicht überlebenden Zellen abzuräumen. Zur Gewinnung der Makrophagen wurden am Vortag der Fusion Balb/c-Mäuse getötet, ihnen das abdominale Fell abgezogen, und mit einer 20G-Nadel (B.Braun Melsungen) wurden 5 ml einer sterilen 0.34 M (≙ 11.6 %) Sucrose-Lösung intraperitoneal injiziert, wobei die Nadelspitze über dem rechten Leberlappen liegengelassen wurde. Nach leichter Massage des Abdomens wurde die Flüssigkeit wieder abgezogen. Die Ausbeute pro Maus betrug $3\text{-}4 \times 10^6$ Makrophagen. Die Zellen wurden in sterilen Polypropylen-Röhrchen (Greiner, Nürtingen) gesammelt, 10 min bei 600 UpM in einer Christ-Minifuge 2 abzentrifugiert und zu 6×10^4 Makrophagen pro ml in HAT-RPMI aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde in 50 µl Mengen pro Vertiefung auf Mikrotiterplatten verteilt und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Dazu wurde dann in 50 µl Tropfen die Fusionsmischung gegeben und 3 Tage später das Volumen auf 200µl durch Zugabe von 100 µl HAT-RPMI pro Loch erhöht. Der erste Mediumwechsel erfolgte wie vorstehend beschrieben weitere 5 Tage später.

3.1.4. Makrokulturen

Nach ungefähr 5 Tagen Selektion mit HAT-RPMI waren die ersten mikroskopisch sichtbaren Klone herangewachsen, die bei Erreichen einer Größe von etwa 100 Zellen/Klon in Gewebekulturplatten mit größerem Volumen transferiert wurden (Tissue Culture Clusters 3524, Costar, USA). Die Menge des Mediums pro Kultur wurde schrittweise auf 1 ml erhöht, danach wurde dreimal wöchentlich 0.5 ml des Mediums ge-

wechselt. Nach 4 Wochen wurde von HAT-RPMI auf RPMI-Medium umgestellt. Alle Zellinien wurden bei Erreichen einer gewissen Zelldichte (3/4 des Bodens der Gewebekulturschale mit Zellen bedeckt) unabhängig von Testergebnissen eingefroren und zum Teil kloniert. Die nach dem Einfrieren (s.3.1.5.) in der Kulturschale verbliebene Zellsuspension wurde auf 1 ml mit Medium verdünnt, und die Zellen zu sehr hoher Zelldichte heranwachsen gelassen. Überstände von diesen Kulturen wurden nach dem Abzentrifugieren der Zellen für Testzwecke verwendet. Die Überstände, die nicht sofort getestet werden konnten, wurden in Äthanol/Trockeneis eingefroren und bei -20°C gelagert.

3.1.5. Einfrieren der Zellen und Klonierung

Die Zellen wurden vorsichtig vom Boden der Kulturschale abgelöst und im Medium suspendiert. Ein 0.8 ml Aliquot der Zellsuspension wurde in Einfrierröhrchen (Greiner, Nürtingen) 10min bei 600 UpM in einer Christ-Minifuge abzentrifugiert, der Überstand wurde abgesaugt, und die Zellen wurden in 1 ml Einfriermedium aufgenommen (RPMI-Medium mit 10 % DMSO). Nach langsamem Einfrieren auf -70°C wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert, zuweilen auch für längere Zeit bei -70°C.

Zur Klonierung wurden ca. 10^3 und 10^4 Zellen entnommen, jeweils mit RPMI-Medium auf 10 ml aufgefüllt und mit $3x10^5$ peritonealen Makrophagen vermischt. In 100 µl Aliquots wurde diese Suspension auf Flachboden-Mikrotiterplatten (Greiner, Nürtingen) verteilt. Nach 3 Tagen Inkubation im Brutschrank wurden zusätzlich 100 µl Medium pro Vertiefung pipettiert.

Der erste Mediumwechsel erfolgte 5 Tage später. Zu diesem Zeitpunkt waren, abhängig von der Wachstumsgeschwindigkeit der Klone, häufig schon Klone mit bloßem Auge zu erkennen, zumindest aber zu mikroskopisch sichtbarer Größe herangewachsen. Klone mit mindestens 100 Zellen wurden ausgesucht und unter Zugabe von 300µl RPMI-Medium in Costar Tissue Culture Clusters umgesetzt; am folgenden oder übernächsten Tag wurden weitere 500 µl Medium hinzugefügt.

Fand die Klonierung zu einem sehr frühen Zeitpunkt nach der Fusion statt, weil einzelne Kulturen sehr schnell wuchsen, wurde sie in HAT-RPMI Medium durchgeführt.

3.1.6. Kultivierung der Hybridom-Zellen

Die klonierten Zellinien wurden in RPMI bei einer Zelldichte zwischen 10^5 und 10^6 Zellen pro ml in Petrischalen kultiviert. Dabei wurde im Medium das foetale Kälberserum in einigen Experimenten durch hitzeinaktiviertes (20 min bei 56°C) Pferdeserum (Gibco) ersetzt.

3.1.7. Gewinnung von antikörperhaltigem Ascites

Mindestens 6-8 Wochen alten Balb/c-Mäusen wurde spätestens am Vortag der Hybridomzellinjektion 0.3 ml Pristan (2,6,10,14-Tetramethylpentadecan) in die Bauchhöhle gespritzt. Ein längerer zeitlicher Abstand erwies sich jedoch als günstiger für eine schnelle Ascitesentwicklung. Bei der ersten Zellpassage wurden die Mäuse dann einige Stunden vor der Injektion der Zellen mit 360 rad bestrahlt. Dies scheint vor allem wichtig zu sein bei der Passage von Hybridomzellen, die keinen reinen Balb/c-Ursprung aufweisen (P. Sym-

mons, pers. Mitteilung) (s.3.3.1.). Circa $2x10^7$ Hybridomzellen aus mindestens zweimal klonierten Zellinien wurden dann i.p. in DPBS injiziert. Nach ca. 7-10 Tagen entwickelte sich in den meisten Fällen ein Ascites, der mit 21G-Nadeln (B.Braun Melsungen) abgezogen wurde. Für weitere Passagen wurden dann 0.3 ml der Ascites-Zellsuspension in Pristan-vorbehandelte Mäuse i.p. gespritzt, der Rest wurde bei 600 UpM abzentrifugiert. Die Zellen wurden eingefroren wie unter 3.1.5. beschrieben, der Überstand bei $-20^{\circ}C$ aufbewahrt.

3.2. Antigenherstellung

3.2.1. Retinazellmembranen

Befruchtete Hühnereier (mit der Bezeichnung HISEX-Bruteier) wurden bei $37,8^{\circ}C$ und 75 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank (W.Ehret, Emmendingen) inkubiert. Am neunten Tag der Inkubation (entspricht Stadium 35-36 der Hamburger-Hamilton-Skala, Hamburger 1951) wurden die Embryonen dekapitiert, die Augen präpariert und in Hank`s A ($-Ca^{2+}$, $-Mg^{2+}$) gelegt. Sklera und Chorioidea wurden mit Pinzetten abgezogen und die Retina vom Glaskörper abgestreift.

Die Plasmamembran-Präparation erfolgte nach einer von Brunette und Till (1971) beschriebenen und von Halfter (1981) modifizierten Methode. Alle Schritte wurden bei $4^{\circ}C$ durchgeführt. 12 Retinae wurden in Hanks A ($-Ca^{2+}$, $-Mg^{2+}$) gesammelt und mit Homogenisierungspuffer (10 mM Tris, pH 7.4, 1.5 mM $CaCl_2$, 1 mM Spermidin) gewaschen. Nach 5 Minuten Zentrifugation bei 600 UpM in einer Christ-Minifuge 2 wurden die Retinae in 4 ml Homogenisierungspuffer aufgenommen und

im Dounce-Homogenisator homogenisiert (10 x L- und 10 x T-Pistill). Die anschließende Zentrifugation (10 min bei 1000g) ergab ein Sediment, das durch Zentrifugation in einem biphasischen System von Polyäthylenglykol-Dextran weiter gereinigt wurde.

Zur Herstellung des biphasischen System wurden Dextran (Dextran T-500, Pharmacia, Uppsala; 13,1g in 67,8 ml H_2O bidest.) und Polyäthylenglykol (Carbowax 6000, Union Carbide, 8,95g in 67.8ml H_2O bidest.) 20 min unter häufigem Rühren bei 70°C gelöst, 15 min in Eis gekühlt und in einen Schütteltrichter gegossen. Nach Zugabe einer NaCl-Lösung (15 mg NaCl in 113,5 ml 0.22 M Natriumphosphatpuffer, pH 6,8) wurde 5 min geschüttelt und das Gemisch 2 Tage im Kühlraum stehengelassen, wobei sich 2 Phasen bildeten. Die untere Phase (Dextran) wurde abgelassen, die obere (Polyäthylenglykol) abgegossen; beide wurden durch Membranfiltration (Millipore-Filter, Porengröße 0.45 µm) sterilisiert und bei 4°C aufbewahrt.

Das Sediment wurde in 5 ml PEG aufgenommen, 10mal mit dem L-Pistill im Dounce Homogenisator homogenisiert und mit 5 ml Dextran versetzt. Beide Lösungen wurden auf einem Vortex-Schüttler durchmischt und durch anschließende Zentrifugation in der Christ-Minifuge (10 min bei 1000g) wieder in 2 Phasen aufgetrennt. Die dabei entstehende Interbande enthält Plasmamembranen, sie wurde mit einer Pasteur-Pipette abgesogen und im 15 ml Corex-Zentrifugenröhrchen mit 4 ml PEG gemischt (Vortex). 4 ml Dextran wurden zugefügt, mit der Suspension vermischt, und durch Zentrifugation in einer

Sorvall-Zentrifuge (HB-4 Rotor, 10 min, 12.000 UpM ≙ 23.500g) wurden wieder 2 Phasen gebildet. Die Interbande wurde abgenommen, zweimal mit DPBS gewaschen und jeweils in einer Tischzentrifuge (Eppendorf) sedimentiert.

3.2.2. Tectumzellmembranen

9 Tage alte Hühnerembryonen wurden dekapitiert, Kopfhaut und Meningen wurden mit Pinzetten entfernt und das optische Tectum freigelegt. Die Tecta von 12 Embryonen wurden in Hank`s A (-Ca^{2+}, -Mg^{2+}) gesammelt, und die anschließende Isolierung der Zellmembranen erfolgte wie unter 3.2.1. für Retinamembranen beschrieben.

3.3. Immunologische Techniken

3.3.1. Immunisierung von Mäusen

Balb/c Mäuse wurden vom Zentralinstitut für Versuchstierzucht in Hannover bezogen und am Max-Planck-Institut für Virusforschung weitergezüchtet. 8-12 Wochen alten weiblichen Mäusen[1] wurde aus der Schwanzvene Testblut entnommen, und 2 Tage später wurde die erste Immunisierung durchgeführt. Dazu wurden 0.1 mg Retina- bzw. 0.065 mg Tectummembranprotein in DPBS suspendiert und mit demselben Volumenteil incompletten Freund`s Adjuvans (GIBCO, Schottland) emulgiert. Die Emulsion wurde intraperitoneal injiziert. 4 Wochen später wurde die Immunisierung in derselben Weise wiederholt, und nach weiteren 3 Wochen wurde in wöchentlichem Abstand mehrmals dieselbe Menge Membranprotein, in DPBS suspendiert,

---

[1] Für einige Fusionen (P, Q, R) wurden Mäuse verwendet, die Merkmale sowohl des q als auch des STU-Haplotyps tragen (Saumweber et al., 1980).

gleichzeitig sowohl intraperitoneal als auch in eine Schwanzvene injiziert.

Bei einem Teil der Mäuse wurde auf die Emulgierung mit IFA verzichtet, und die Immunisierung erfolgte von Anfang an intravenös und intraperitoneal mit in DPBS suspendierten Membranen.

3.3.2. Darstellung von Antikörperreagentien

3.3.2.1. Kaninchen-Anti-Maus-Fab-Antikörper (KAM-Fab)

KAM-Fab wurde mir freundlicherweise von Dr. Harald Saumweber zur Verfügung gestellt. Die Herstellung der Maus-Fabγ-Fragmente umfaßte einen Reinigungsschritt an Protein A-Sepharose (Pharmacia, Uppsala, Schweden) zur Isolierung der Immunglobuline, anschließende Spaltung des wieder eluierten Immunglobulins mit Papain (Serva, Heidelberg) in Fab- und Fc-Fragmente, Gelfilration auf Sephadex G-50 (Pharmacia) und Nachreinigung an Protein A-Sepharose, um restliche Fc-Fragmente zu entfernen (Saumweber, 1980).

Die gereinigten Fabγ-Fragmente wurden für die Immunisierung von Kaninchen verwendet, aus deren Seren nach mehrmaliger Injektion die IgG-Fraktion nach Fahey (1967) isoliert wurde. KAM-Fab wurde aus dieser rohen IgG-Fraktion mit an Sepharose 4B gekoppelten Maus-Fabγ-Fragmenten gereinigt (Saumweber, 1980).

3.3.2.2. Jodierung von Proteinen

Proteine wurden nach der Methode von Greenwood et al. (1963) jodiert. Alle Glas- und Plastikmaterialien wurden vor Gebrauch mit Silikon beschichtet und eine Stunde bei 100°C

im Trockenschrank belassen. G 75-Sephadex (Pharmacia, Uppsala) wurde nach Vorschrift des Herstellers quellen gelassen und in DPBS ($-Ca^{2+}$,$-Mg^{2+}$) suspendiert. Mit der Gelsuspension wurde eine silikonisierte Bio-Rad-Säule (5 ml Volumen) beschickt, anschließend gesättigt mit 1 ml einer 10%igen RSA-Lösung in DPBS ($-Ca^{2+}$, $-Mg^{2+}$) und mit vier Säulenvolumina einer 0.5%igen RSA-Lösung in DPBS ($-Ca^{2+}$, $-Mg^{2+}$) eluiert. Kurz vor dem Auftragen der jodierten Probe wurde noch einmal mit einem Säulenvolumen der letztgenannten RSA-Lösung gewaschen.

Für die Jodierung wurde folgendes in ein silikonisiertes Reaktionsgefäß (Greiner, Nürtingen) pipettiert: 18,2 µl RAM-Fab (≙ 27,3 µg in 50mM NaP), 600 µCi $Na^{125}J$ (100 mCi/ml, trägerfrei; Amersham Buchler, Braunschweig) und 10 µl Chloramin-T (5 mg/ml in 50 mM NaP). Der Ansatz wurde 20 sec mit einer Pipette bei Raumtemperatur gemischt, durch Hinzufügen von 100 µl einer $Na_2S_2O_5$-Lösung (1,2mg/ml) und 100 µl einer KJ-Lösung (10 mg/ml in 10 % foetalem Kälberserum (Gibco, Glasgow)) wurde die Reaktion unterbrochen. Das Gemisch wurde auf die vorbereitete G75-Säule aufgetragen und einziehen gelassen. Anschließend wurden sofort 0.5 ml einer 0.5%igen RSA-Lösung in DPBS ($-Ca^{2+}$, $-Mg^{2+}$) aufgetragen und einziehen gelassen. Mit 0.5 ml der RSA-Lösung wurde noch einmal nachgewaschen. Nach Aufsetzen des Adaptors wurde die Säule bei einer Tropfgeschwindigkeit von 9 ml/Stunde mit derselben RSA-Lösung eluiert. Fraktionen zu 8 Tropfen wurden in silikonisierten Reaktionsgefäßen aufgefangen. 2µl jeder Fraktion wurden in einem Gammazähler ausgezählt (GC 4000, Deutsche Intertechnique). Die Fraktionen des Proteingipfels wurden

vereinigt, eine 2 µl Probe davon wurde noch einmal ausgezählt und die Lösung dann auf 50.000cpm/µl eingestellt. Jeweils 50 µl des jodierten Proteins wurden in silikonisierten Reaktionsgefäßen bei -20°C eingefroren. Die spezifische Aktivität betrug etwa 22 mCi pro mg KAM-Fab.

3.3.3. Immunologische Nachweismethoden

3.3.3.1. Radioimmuntest

Vorbereitung der Platten:

PVC-Mikrotiterplatten (F-Form disposable, Cooke; bezogen von Dynatech, Denkendorf) wurden vor Gebrauch sterilisiert. Dazu wurden pro Vertiefung 200 µl 70%igen Äthanols pipettiert, der durch Abkippen wieder entfernt wurde. Anschließend wurden die Platten 30 min unter UV-Licht gestellt.

Pro Vertiefung wurden 100 µl einer0.1%igen Concanavalin A-Lösung (Serva, Heidelberg) in Hank`s A ($-Ca^{2+}$, $-Mg^{2+}$) pipettiert und eine Stunde bei Raumtemperatur stehengelassen. Die Lösung wurde dann auf Zellstoff abgekippt und die Platte dreimal mit Hank`s A ($-Ca^{2+}$, $-Mg^{2+}$) gewaschen. Derart vorbehandelte PVC-Platten konnten verwendet werden, wenn Retinazellen als Antigen eingesetzt wurden; für Tectumzellen mußte die Vorbehandlung modifiziert werden. In jede Vertiefung wurde dafür ein rundes derivatisiertes Deckgläschen mit UHU-Sekundenkleber geklebt, und nach dem Trocknen und Sterilisieren wurde dann erst die ConA-Behandlung vorgenommen.

Derivatisierung von Glasplättchen:

Runde Deckgläschen (Ø 5 mm, #2; Bachofer, Reutlingen) wurden mit HNO_3 Konz. gereinigt, mit H_2O bidest. gespült, ge-

trocknet und in einem Rundkolben mit 100 ml einer 10%igen Lösung von 3-(Äthoxysilyl)-propylamin in DMSO 1 Std. bei 116°C unter Rückfluß erhitzt. Die Plättchen wurden anschließend dreimal zunächst mit DMSO, dann mit destilliertem H_2O gespült und getrocknet.

Zellpräparation:

Zur Herstellung der Einzelzellsuspension wurden Retinae oder Tecta von 9 Tage alten Hühnerembryonen verwendet (Isolierung des Gewebes s. 3.2.1.). Jeweils 4 Retinae oder Tecta wurden in 1 ml 0.1%igem Trypsin (2x kristallisiert, salzfrei; von Worthington Biochemical Corp., Code TRL), gelöst in Hank`s A ($-Ca^{2+}$, $-Mg^{2+}$), 20min bei 37°C inkubiert. Die Trypsinlösung wurde abgesaugt, das Gewebe viermal mit 12 ml Hank`s A ($-Ca^{2+}$, $-Mg^{2+}$) gewaschen und in 1ml Eagle`s Kulturmedium (Claviez, 1981) mit 25 µg DNase I/ml (Worthington Biochem. Corp., Code DP) 5 min bei 37°C inkubiert. Die Dissoziation in Einzelzellen erfolgte durch vorsichtiges Aufziehen in Pasteur-Pipetten, deren Öffnung etwas zugeschmolzen war. Es wurde 10x mit einer weiteren und 10x mit einer engeren Pipette aufgezogen. Durch 10-minütige Zentrifugation bei 600 UpM wurden die Zellen gesammelt, Retinazellen wurden in Eagle`s Kulturmedium aufgenommen, Tectumzellen in Hank`s A ($-Ca^{2+}$, $-Mg^{2+}$), und jeweils auf eine Zellzahl von $1x10^7$ Zellen/ml eingestellt.

Durchführung des Tests:

100 µl der Zellsuspension wurden pro Vertiefung der vorbereiteten Platten pipettiert und abgedeckt im Brutschrank bei 37°C und 4 % CO_2 inkubiert. Nach 15 min wurde bei den Tectumzellen der Hank`s A-Puffer gegen 100 µl Eagle`s Kulturme-

dium ausgetauscht. Retina- und Tectumzellen wurden über Nacht kultiviert, das Medium wurde anschließend vorsichtig abgesaugt und die angewachsenen Zellen durch Zugabe von 50 µl einer 4%igen Paraformaldehyd-Lösung in DPBS für 10 min fixiert. Das Fixiermittel wurde abgesaugt, und die Zellen wurden zweimal 5 min mit DPBS gewaschen. Je 100 µl der Hybridomzellkultur-Überstände oder der in RPMI-Medium verdünnten Mausseren wurden mit den Zellen 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit DPBS + 0.1 % Gelatine wurden pro Vertiefung 10^5 cpm ^{125}J-RAM-Fab in 100 µl Kulturmedium gegeben und 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Der radioaktive Überstand wurde abgesaugt, die Proben wurden dreimal mit je 200 µl DPBS +0.1 % Gelatine gewaschen, sorgfältig trockengesaugt und von der Platte abgeschnitten. Die gebundene Radioaktivität wurde im Gammazähler bestimmt, wobei die Zählausbeute ungefähr 85 % betrug. Zur Ermittlung des Hintergrunds wurde anstelle des Antiserums mit Präimmunserum (Nullserum) bzw. anstelle des antikörperhaltigen Zellkulturüberstandes mit Kulturmedium inkubiert. Radioimmunpositive Seren und Hybridomüberstände zeigten, verglichen mit der Kontrolle, eine 5- bis 30-fach erhöhte Bindung von ^{125}J-KAM Fab.

3.3.3.2. Ouchterlony Doppelimmundiffusion

Um die Immunglobulinklassenzugehörigkeit der von den Hybridomzellen produzierten Antikörper zu bestimmen, wurden die entsprechenden Zellkulturüberstände 5- oder 10-fach durch Lyophilisieren konzentriert. Der Test erfolgte nach einer Doppelimmundiffusions-Methode von Ouchterlony und

Nilsson (1978) auf Objektträgern. Klassen- und subklassenspezifische Anti-Maus-Immunglobulin-Antikörper wurden von Byk-Mallinckrodt (Nordic Immunology, Großbritannien) bezogen.

3.3.3.3. Bestimmung von Immunglobulin Konzentrationen

Die Menge der von den Hybridomzellen an das Kulturmedium abgegebenen Immunglobuline G wurde mit Hilfe eines von P.Symmons (pers. Mitt.) entwickelten Tests ermittelt. Dazu wurden die Zellkulturüberstände 1:1000 mit DPBS ($-Ca^{2+}$, $-Mg^{2+}$) verdünnt, und in Triplikaten wurden 150 µl dieser Verdünnungen pro Vertiefung einer PVC-Mikrotiterplatte (V-Form; Cooke, bezogen von Flow) pipettiert. Ebenso wurde zur Aufstellung einer Eichkurve mit Maus-IgG-Lösungen verfahren (Maus-IgG von Miles, Frankfurt), die 1, 10, 25, 50 und 100 µg IgG/ml enthielten. Ascitesflüssigkeiten wurden vor der Verdünnung mit DPBS mit RPMI-Medium 1:100-1:1000 verdünnt, um mit Zellkulturüberständen vergleichbare IgG-Konzentrationen zu erzielen. Nach einstündiger Adsorption bei Raumtemperatur wurde der Überstand abgesaugt und die restliche Proteinbindungskapazität durch 2-stündige Inkubation der Vertiefungen mit je 200µl 0.1% Rinderserumalbumin (SIGMA, Cohn Fraktion V) in DPBS ($-Ca^{2+}$, $-Mg^{2+}$) abgesättigt. Dieser und die folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Vertiefungen wurden zweimal mit 300µl DBPS ($-Ca^{2+}$, $-Mg^{2+}$) gewaschen und anschließend 12 Std. mit jeweils 10^5 cpm ^{125}J-KAM Fab in 150µl DPBS ($-Ca^{2+}$, $-Mg^{2+}$) mit 0.1% Triton X-100 und 0.1% RSA inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit je 300µl 0.1% Triton X-100, 0.1% RSA in DPBS ($-Ca^{2+}$, $-Mg^{2+}$)

für 10 min wurde sorgfältig trockengesaugt, die Vertiefungen ausgeschnitten und die gebundene Radioaktivität im Gammazähler bestimmt.

3.3.4. Indirekte Immunfluoreszenz

3.3.4.1. Immunfluoreszenz an Einzelzellkulturen

3.3.4.1.1. Herstellung von Zellpräparaten mit Trypsin

Retina- und Tectumeinzelzellen wurden hergestellt wie unter 3.3.3.1. beschrieben. Zur Gewinnung von Fibroblasten wurde Lungengewebe von 9 Tage alten Hühnerembryonen genommen, das nach Zerzupfen in kleine Stücke dissoziiert wurde wie für Retina und Tectum beschrieben mit der Änderung, daß hier anstelle der 0.1%igen Trypsin-Lösung eine 0.2%ige eingesetzt wurde. Ebenso wurde verfahren mit Herzgewebe, von dem Perikard und Gefäßstamm abpräpariert worden waren.

Die Zellsuspensionen wurden auf folgende Konzentrationen in Hank`s A ($-Ca^{2+}$, $-Mg^{2+}$) eingestellt: Retina $1.4x10^7$ Zellen/ml, Tectum $1.2x10^7$ Zellen/ml, Fibroblasten $1.6x10^6$/ml, Herz $3.2x10^6$/ml. Davon wurden jeweils 100 µl auf ein steriles, derivatisiertes und mit ConA beschichtetes Deckgläschen mit 13mm Durchmesser pipettiert (Derivatisierung und Beschichtung siehe 3.3.3.1.), vorsichtig darauf verstrichen und 15 min bei Raumtemperatur in einer sterilen Petrischale (Greiner, Nürtingen) absitzen gelassen. Anschließend wurde mit 10 ml vorgewärmtem Eagle`s Kulturmedium überschichtet und 15 min bei $37^oC$ im Brutschrank inkubiert. Die Deckgläschen wurden dann in eine Petrischale mit frischem Eagle`s Kulturmedium überführt und über Nacht im CO_2-Brutschrank bei 37^o belassen.

3.3.4.1.2. Herstellung von Zellpräparaten mit Papain

Retina- und Tectumgewebe von Hühnerembryonen verschiedenen Alters wurden isoliert wie unter 3.3.3.1. ausgeführt. Die Dissoziation in Einzelzellen erfolgte in Anlehnung an eine von Sarthy und Lam (1979) beschriebene Methode. Sie ergibt Zellen mit besser und länger erhaltenen Fortsätzen. Dazu wurde das Gewebe zweimal in Ringer M-Lösung (NaCl 125.4 mM, KCl 3,6 mM, $MgCl_2$ 1.2 mM, $NaHCO_3$ 22.6 mM, NAH_2 PO_4 0.1 mM, Na_2HPO_4 0.4 mM, Na_2SO_4 1.2 mM, Glucose 10mM), pH7.3 mit 2.5 mM EGTA gewaschen und 30 min bei 37°C mit Papain (Boehringer, Mannheim; 1 mg/ml in Ringer M + 2.5 mM EGTA) verdaut. Nach zweimaligem Waschen mit Ringer M + 1.15 mM $CaCl_2$ (ohne Zentrifugation) wurde das Gewebe in Ca-haltiges Ringer M mit 0.1 % RSA und DNase I (0.1 mg/ml) überführt und durch vorsichtiges Pipettieren mit einer Pasteur-Pipette dissoziiert. Für Retinazellen genügte ein fünffaches Hochziehen in die Pipette, Tectumzellen mußten 10-15mal aufgezogen werden. Die Zellsuspensionen wurden in derselben Lösung auf $8x10^5$ Zellen/ml eingestellt; anschließend wurde verfahren wie für mit Trypsin hergestellte Zellpräparate beschrieben. Nach einer Inkubationszeit von 2-2,5 Stunden wurden die Präparate für die Immunfluoreszenz eingesetzt; diese Zeit erwies sich als ausreichend, um die Zellen fest an die Unterlage anzuheften.

3.3.4.1.3. Anfärbung und Photographie

Die Deckgläschen mit den angewachsenen Zellen wurden aus dem Medium genommen, und die Unterseite wurde trockengewischt, damit das Plättchen mit einem Tropfen UHU-Sekunden-

kleber auf einem Objektträger fixiert werden konnte. Überschüssiges Medium wurde vorsichtig mit Zellstoff vom Rand her abgesaugt, der Objektträger um das Gläschen herum sorgfältig getrocknet, und 75 µl Antikörper enthaltende Lösung (Zellkulturüberstand oder geeignet in Medium verdünnte Mausseren und Ascites) wurden auf die Zellen pipettiert. Nach 30 min Inkubation in einer feuchten Kammer bei 37°C (im Brutschrank) wurde der Überstand mit Zellstoff abgesaugt und das Präparat dreimal 10 min mit je 100 µl Eagle`s Kulturmedium gewaschen. Mit 75 µl des fluoreszierenden sekundären Antikörpers (FITC-konjugierte IgG-Fraktion von Kaninchen-Anti-Maus IgG, Miles;1:40 verdünnt in Eagle`s Kulturmedium) wurde für 20 min auf dieselbe Weise inkubiert und anschließend gewaschen. Mit 50 µl farblosem Eagle`s Kulturmedium (ohne Phenolrot), enthaltend 1mg/ml p-Phenylendiamin, um das Ausbleichen der Fluoreszenz bei Belichtung zu verhindern (Johnson et al., 1981), wurde das Präparat eingedeckt und ein sauberes Deckgläschen mit Silikon"füßchen" (Baysilon-Paste, Bayer, Leverkusen) als Abstandshalter montiert. Als Kontrollen wurden Nullseren, Zellkulturmedien oder NS-1 Zellkulturüberstände eingesetzt. Seren und Hybridom-Zellkulturüberstände wurden als positiv gewertet, wenn sie eine reproduzierbare und im Vergleich mit der Kontrolle deutlich sichtbare Membran- oder intrazelluläre Fluoreszenz zeigten. Der Test erfaßte allerdings hauptsächlich Antikörper, die an Strukturen der äußeren Membranoberfläche binden, da mit intakten Zellen gearbeitet wurde, die impermeabel für Antikörper sind.

Die Präparate wurden in einem Zeiss-Universal-Mikroskop,

ausgerüstet mit Epifluoreszenz (Exzitationsfilter 435-490nm, Sperrfilter 520 nm), betrachtet und photographiert. Als Film für die Fluoreszenzphotographie und die Phasenkontrastbilder wurde Tri-X-Pan (Kodak) verwendet.

3.3.4.2. Indirekte Immunfluoreszenz an Gefrierschnitten

Zum Nachweis von Antigen im Gewebe wurde indirekte Immunfluoreszenz an unfixierten und Paraformaldehyd-fixierten Kryostatschnitten ausgeführt. Dazu wurden Retinae und Tecta verschiedenen Alters aus Hühnerembryonen präpariert. Die Retina wurde auf schwarzen Membranfiltern flach ausgebreitet (Sartorius-Membranfilter, Typ SM 13006), dann - ebenso wie Tectum - 6 Std in frisch hergestelltem 4%igem Paraformaldehyd in DPBS fixiert, mit DPBS gewaschen und bei -170°C in N_2 gekühltem Isopentan eingefroren. Die Präparate wurden mit Tissue-Tek (Lab-Tek Products, Miles Laboratories, Elkhart/Indiana, USA) aufgefroren und im Kryostaten (SLEE, Mainz) bei -20°C in 10 µm dicke Schnitte geschnitten. Die Schnitte wurden mit Objektträgern abgenommen, die auf verschiedene Weise vorbehandelt worden waren, um ein Abschwimmen der Schnitte zu verhindern: a) Derivatisierung mit 3-(Triäthoxysilyl)propylamin, wie unter 3.3.3.1. beschrieben, erwies sich als günstig für nicht fixiertes Material. b) Beschichtung mit 3 % Gelatine oder einer Mischung von 0.5 % Gelatine und 0.05% $KCr(SO_4)_2$ wurde mit Erfolg für fixiertes Gewebe benutzt. Die Schnitte wurden anschließend bei Zimmertemperatur luftgetrocknet, dann mit 50 µl 10%igen Kaninchen-Präimmunserums in 0.1 M NaP, pH7.4, für 10 min bei Raumtemperatur vorbehandelt und über Nacht bei 4°C mit dem

monoklonalen Antikörper (Kulturüberstand oder verdünnter Ascites) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 0.1M NaP, pH 7.4, wurde 20-30 min bei Raumtemperatur mit 50 µl FITC-konjugiertem Kaninchen-Anti-Maus IgG (Miles, Frankfurt) in einer Verdünnung von 1:40 (in 0.1 M NaP mit 1 % RSA) inkubiert. Mit 0.1M NaP wurde dreimal gewaschen und die Schnitte dann in demselben Puffer unter Zusatz von 1 mg/ml p-Phenylendiamin eingedeckt. Die Auswertung erfolgte wie unter 3.3.4.1. beschrieben.

3.3.5. Nachweis von Glykolipidantigenen

3.3.5.1. Isolierung von Gangliosiden mit Tetrahydrofuran

Zur Isolierung von reinen Gangliosidfraktionen wurde eine von Tettamanti et al. (1973) entwickelte Methode benutzt, die eine vollständige Extraktion speziell der Multisialoganglioside erlaubt mit geringerer Verunreinigung durch Glykoproteine als die klassische Methode nach Folch (1951).

0.5-1 g Gewebe (Naßgewicht) wurde mit 5 ml auf -20°C vorgekühlten Acetons homogenisiert. Das Sediment, das sich nach 10 Minuten Zentrifugation bei 6000 g und 4°C ergab, wurde unter einem Stickstoffstrom getrocknet und 2 min in 1 ml 0.2M Kaliumphosphatpuffer, pH 6.8, homogenisiert. Nach Zugabe von 8ml Tetrahydrofuran (THF) wurde weiterhin 1 min homogenisiert, anschließend 10 min bei 15°C und 12 000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein graduiertes Zentrifugenglas abgegossen, das Sediment mit 1 ml KP und 4 ml THF erneut extrahiert. Zentrifugiert wurde wie vorstehend beschrieben. Das Sediment wurde noch zweimal mit jeweils 1 ml KP und 4 ml THF extrahiert.

Die vereinigten Überstände wurden mit 0.3 Volumenteilen Diäthyläther 2 min heftig geschüttelt. Durch 20 Minuten Zentrifugation bei 15°C und 600g wurden die sich bildenden Phasen getrennt, die untere wässrige Phase wurde aufgehoben, die organische Phase wurde mit 0.1 Volumenteilen H_2O bidest. versetzt, geschüttelt und zentrifugiert wie zuvor. Die wässrigen Phasen wurden vereinigt und 4 Tage gegen H_2O bidest. bei 4°C dialysiert mit mindestens dreimaligem Wasserwechsel pro Tag. Zur Entfernung unlöslichen Materials wurde anschließend 5 min bei 3000g zentrifugiert. Der klare Überstand, der die Ganglioside enthält, wurde gefriergetrocknet. Vor Gebrauch wurde das Lyophilisat in 100 µl H_2O bidest. aufgenommen und dann bei -20°C für einige Wochen aufbewahrt.

3.3.5.2. Dünnschichtchromatographie von Gangliosiden

Zur Analyse und für den Antigennachweis wurden die Gangliosid-Präparate auf Kieselgel-Dünnschichtplatten (HPTLC-Platten, 10x20cm, beschichtet mit 0.2 mm Kieselgel 60; E.Merck, Darmstadt) in einem dualen Laufmittelsystem aufgetrennt (Rösner, 1980), das besonders für die Multisialoganglioside eine bessere Separation erlaubt als herkömmliche Systeme (van den Eijnden, 1971; Ando et al., 1978).

4 µl der Probe, entspechend ca. 10 µg Lipid-gebundener Neuraminsäure, wurden als Strich 1.5 cm vom Rand entfernt aufgetragen und mit Heißluft getrocknet. Die Platten wurden 15min in einem Wärmeraum bei 37°C äquilibriert und ebenfalls bei 37°C im Laufmittel A (Chloroform-Methanol - 12 mM $MgCl_2$ - 15 N NH_4OH (60:35:7:3.5)) entwickelt. Der Lauf wurde unterbrochen, nachdem die Front 3/4 der Höhe erreicht hatte.

Die Platte wurde mit warmer Luft getrocknet und im Laufmittel B (Chloroform - Methanol - 12 mM $MgCl_2$ (58:40:9 v/v/v)) bei 37°C entwickelt. Die Platte wurde mit heißer Luft getrocknet, nach dem Abkühlen mit Resorcinol-Reagenz besprüht (Svennerholm, 1957) und zum Sichtbarmachen der Ganglioside mit der beschichteten Seite nach unten auf eine 100°C heiße Glasplatte gelegt. Die Banden erscheinen nach einigen Minuten tief violett. Die Fraktionen wurden, soweit möglich, durch Vergleich mit Standards identifiziert, die nach der Nomenklatur von Svennerholm (1980) benannt worden waren. Benutzt wurden GM_1, GD_{1a} und GT (alle von Supelco), GM_2, GD_{1b} und GT_{1b} (von Seromed, München), sowie GD_3, GQ_{1b}, GP und eine Mischung aus GD_3, GD_{1a}, GD_{1b}, GT_{1b}, GQ_{1b} und GP (ein Geschenk von Prof. H. Rösner, Hohenheim).

3.3.5.3. Antigennachweis auf Dünnschichtchromatographieplatten

Gangliosidproben, die nach der unter 3.3.5.2. beschriebenen Methode aufgetrennt worden waren, wurden benutzt, um gegen Glycosphingolipide gerichtete Antikörper nachzuweisen und ihre Spezifität zu identifizieren. Zur Anwendung kam eine von Magnani et al. (1981) beschriebene Prozedur, die etwas modifiziert wurde. Die Platten wurden nach dem Lauf getrocknet und 10 min bei 4°C mit Puffer A (DPBS + 1 % Polyvinylpyrrolidon; Sigma) überschichtet. Über Nacht wurde dann mit Antikörper-haltigem Kulturüberstand (1:4 mit Puffer A verdünnt) bei 4°C inkubiert. Das Chromatogramm wurde sechsmal mit DPBS gewaschen und mit ^{125}J-KAM Fab (10^6cpm/ml) in Puffer A überschichtet. Nach vierstündiger Inkubation bei 4°C wurde die Platte sechsmal mit DPBS gewaschen, ge-

trocknet, in Frapan-Folie (Kraft, Lindenberg) eingewickelt und bei -80°C auf Kodak-Röntgenfilm und einer DuPont Cronex Quanta II Verstärkerfolie exponiert. Durch Vergleich mit mitgelaufenen Standardgangliosiden, die durch Ansprühen mit Resorcinol sichtbar gemacht wurden, konnte die gebundene Radioaktivität bestimmten Gangliosiden zugeordnet werden.

3.4. Elektrophorese und analytische Nachweismethoden

Proteine wurden in 0.1 % SDS auf Polyacrylamidgelen im System nach Laemmli (1970) aufgetrennt. Die Analyse wurde auf 1.5mm dicken 6-15%igen Gradienten-Flachgelen durchgeführt. Zur Vorbereitung der Proben wurden Retinae oder Tecta in Homogenisierungspuffer (0.01M Tris-HCl, pH 7.4, 5mM $MgCl_2$, RNase 50 µg/ml, DNase 50µg/ml) mit einem Teflon-Homogenisator homogenisiert und in 2 min bei 8000g pelletiert. Das Sediment wurde zweimal gewaschen mit 1 mM NaP, pH7.8, aufgenommen im gleichen Volumen 10%igen SDS in H_2O bidest., mit 5 µl ß-Mercaptoäthanol versetzt und 2-5 min in kochendem Wasser erhitzt. Nach Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und mit Probenpuffer (10 % Glycerin (w/v), 5 % ß-Mercaptoäthanol, 2.3 % SDS, 0.0625 M Tris-HCl, pH 6.8) im Verhältnis 3:1 gemischt, 3 min in kochendes Wasser gestellt und aufgetragen. Zellmembranmaterial von Retina und Tectum wurde direkt in Probenpuffer aufgenommen und behandelt wie oben beschrieben.

Die Proteinbanden wurden sichtbar gemacht durch Fixierung für 3 Std in 30 % (v/v) Methanol / 5 % (w/v) Sulfosalicylsäure / 11.5 % (w/v) Trichloressigsäure, Anfärbung für 2 Std in 50 % Methanol / 10% Eisessig / 0.1 % Coomassie Brilliant

Blau R 250, und Entfärbung mit zunächst 50 % Methanol / 10 % Eisessig, anschließend dann mit 30 % Methanol / 10 % Eisessig.

Protein-Konzentrationen wurden nach der Methode von Bradford (1976) bestimmt.

3.5. Explantatkulturen embryonaler Hühnerretina

3.5.1. Herstellung von Explantaten

Retinae von 6 Tage alten Embryonen wurden intakt präpariert wie unter 3.2.1. beschrieben. Mit der vitrealen Seite nach oben wurden sie auf einem schwarzen Membranfilter (Sartorius-Membranfilter GmbH, Göttingen, Typ SM 13006; 1 Std. vorinkubiert mit 0.1 mg ConA/ml Hank`s A, gespült mit H_2O bidest.) ausgebreitet, festgesaugt und durch Andrücken an einigen Punkten entlang der Peripherie fest angeheftet (Abb.1). Mit einem McIlwains Tissue Chopper und Rasierklingen wurden die Retinae in 275-300 µm breite Streifen geschnitten (Abb.2), die vorsichtig in mit nativem Ratten-

Abb.1
6d embryonale Hühnerretina, ausgebreitet auf einem Membranfilter

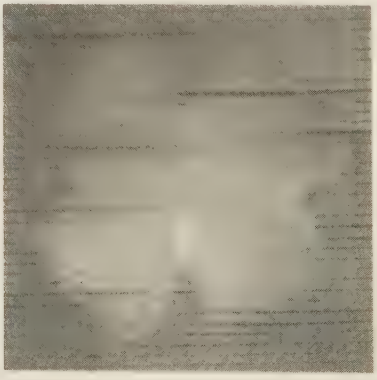


Abb.2
6d Hühnerretina in 275 µm breite Streifen geschnitten

Kollagen beschichtete Petriperm-Schalen (Heraeus) oder Petrischalen (3 cm Ø, Greiner, Nürtingen) mit der Ganglienzellschicht nach unten transferiert wurden.

Die Kollagenherstellung erfolgte in Anlehnung an die von Bornstein (1958) und Elsdale (1972) beschriebenen Methoden und findet sich genau ausgeführt bei Claviez (1981), ebenso wie die Beschichtung der Platten. Nach zweistündiger Adhäsion der Retina an das Kollagen wurde mit Eagle`s Kulturmedium auf 1.5 ml aufgefüllt und bei 37°C im CO_2-Brutschrank inkubiert. Eine detaillierte Beschreibung der Explantatherstellung und -kultivierung liefern Schloßhauer (1981) und Claviez (1981).

Für Fluoreszenzuntersuchungen der aus der Retina auswachsenden Ganglienzellaxone und für Zeitrafferaufnahmen wurde die Retina nach dem Ausbreiten auf dem Filter mit Rhodaminisothiocyanat vorgefärbt (Bonhoeffer und Huf, 1980), einem Fluoreszenzfarbstoff, der von den Zellen aufgenommen und anterograd in die auswachsenden Axone transportiert wird. Nach der Färbung, deren Durchführung von Kern-Veits (1981) und Bonhoeffer (1982) beschrieben wurde, und der anschließenden Herstellung von Retinastreifen (s.oben) wurde das Gewebe auf Retinamonolayern explantiert. Die Monolayer wurden angefertigt wie unter 3.3.4.1.1. ausgeführt. Auf einem Deckgläschen von 2 cm Ø ließ man 5.5×10^6 Zellen anwachsen und kultivierte darauf die Explantate bei 37°C im CO_2-Schrank.

3.5.2. Mikroskopische Untersuchung und Photographie

Nicht gefärbte Explantate wurden mit einem inversen Zeiss-Mikroskop im Dunkelfeld betrachtet und auf Ilford Pan-F-Film (18 DIN) photographiert.

Fluoreszenzmikroskopie RITC-gefärbter Axone wurde mit Epifluoreszenz (Anregungswellenlänge 545 nm, Sperrfilter >590 nm) im Axiomat (Zeiss) ausgeführt, wobei die Abbildung durch eine Restlichtverstärkungskamera (Hamamatsu) auf einen Monitor (Siemens) übertragen wurde.

3.5.3. Zeitrafferaufnahmen

Zeitrafferfilme auswachsender Axone wurden mit RITC-vorgefärbten Explantaten hergestellt, die auf Retina-Monolayern kultiviert wurden (s. 3.5.1.). Nach 20 Stunden Inkubation im CO_2-Brutschrank wurden die Kulturschalen im Wärmeraum bei 37°C und einer 4:96 CO_2:Luft-Atmosphäre auf den Objekttisch eines inversen Mikroskops (Diavert, Leitz) montiert. Die aufgesetzte Videokammera (National, Modell WV-261) war mit einem Video-Aufzeichnungsgerät (National Time-lapse V TR NV-8030) verbunden. Aufnahmen wurden im Abstand von 20 Sekunden gemacht, nur für die Dauer der Aufnahme wurde das Objekt mit Licht geeigneter Wellenlänge (s. 3.5.2.) bestrahlt.

3.6. Chemikalien

Die Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, als p.A.-Substanzen von der Firma Merck, Darmstadt, bezogen. PEG 4000 wurde im Reinheitsgrad "für die Gaschromatographie" verwendet. Elektrophorese-Reagentien, Aminopterin, Hypoxan-

thin, Thymidin, N-Acetylneuraminsäure und ConA wurden von Serva, Heidelberg, geliefert; SDS von Bio-Rad-Laboratories, München. 8-Azaguanin, RITC und RSA wurden von Sigma, München, bezogen und Pristan von EGA-Chemie, Steinheim.

4. E R G E B N I S S E

4.1. Darstellung der Antigene

Plasmamembranen von 9 Tage altem embryonalem Hühnerretina- und -tectumgewebe wurden, wie in Material und Methoden beschrieben, isoliert und auf einem SDS-Polyacrylamidgel analysiert (Abb.3). Im Vergleich mit aus diesen Geweben

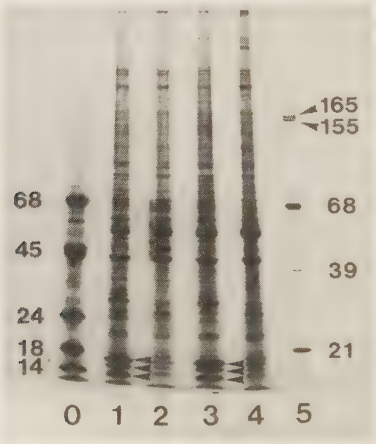


Abb.3 Vergleich des Proteinmusters von Retina- und Tectummembranen mit dem jeweiligen Gesamthomogenat: Die Präparationen aus 9 Tage altem embryonalem Hühnergewebe wurden auf einem 6-15% SDS-Polyacrylamidgel nach Laemmli (1970) aufgetrennt. (1) Retinahomogenat. (2) Retinamembranen. (3) Tectumhomogenat. (4) Tectummembranen. In (0) und (5) wurden Eichproteine folgender Molekulargewichte aufgetragen:
(0) Rinderserumalbumin (68.000); Eialbumin (45.000); Trypsinogen (24.000); ß-Lactoglobulin (18.400); Lysozym (14.300).
(5) ß`-Untereinheit der RNS-Polymerase aus E.coli (165.000); ß-Untereinheit (155.000); Rinderserumalbumin (68.000); α-Untereinheit (39.000); Trypsin-Inhibitor (21.000).
Die Molekulargewichte sind neben den Eichproteinen in Kilodalton angegeben. Die Pfeile kennzeichnen Histone des Zellkerns.

hergestelltem Gesamthomogenat (s.3.4.) fällt eine Anreicherung für die langsamer wandernden Proteinbanden auf. Die Banden im niedrigeren Molekulargewichtsbereich unter 40 000 Dalton, von denen die prominentesten den Histonproteinen des Zellkerns entsprechen, sind nur noch schwach sichtbar. Dieser Befund deutet darauf hin, daß bei der Reinigung der Membranfraktion Zellkerne zum größten Teil abgetrennt wurden, und ist in Übereinstimmung mit dem Bild, das sich beim Betrachten der angereicherten Membranfraktion im Mikroskop ergibt. Man sieht lichtmikroskopisch fast ausschließlich Membranvesikel.

Für die Tectummembranen wird im Vergleich mit dem Homogenat ein Anreicherungsfaktor von vier angegeben (Halfter et al., 1981), basierend auf der Messung der spezifischen Aktivitäten der Leitenzyme Mg^{2+}-ATPase, Na^{+}-K^{+}-ATPase und alkalische Phosphatase. Die relativ geringen Unterschiede im Proteinmuster von Membranpräparation und Homogenat spiegeln diesen nicht sehr hohen Reinigungsfaktor wider.

Retina und Tectum zeigen eine weitgehende Übereinstimmung der mit dieser Methode darstellbaren Proteinzusammensetzung.

4.2. Etablierung der Zellinien

4.2.1. Immunantwort

Insgesamt 28 Mäuse wurden mit Retinaeinzelzellen bzw. Retina- oder Tectummembranen immunisiert wie in Material und Methoden beschrieben. Die Seren, die von den Mäusen vor Entnahme der Milz gewonnen werden konnten, wurden in einer Reihe von Verdünnungen radioimmunologisch gegen Retina- bzw.

Tectumzellen ausgetestet. Die Testergebnisse bei 1000-facher Verdünnung sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Tabelle 1: Immunantwort der Mäuseseren im Radioimmuntest

Maus Nr.	Antigen	cpm gebunden/Hintergr.	Fusionsbezeichnung
3	Retinaeinzelzellen	13 000 / 1050	M
4	Retinaeinzelzellen	12 600 / 900	N
2	Retinamembranen	12 800 / 950	O
9	"	11 100 / 1000	P
10	"	12 700 / 850	Q
8	"	12 800 / 900	R
11	"	12 600 / 950	S
13	"	13 000 / 1000	T
21	"	12 600 / 950	U
26	Tectummembranen	11 900 / 900	V

Die Mäuseseren wurden bei 1000-facher Verdünnung gegen entspechend verdünntes Nullserum ausgetestet wie in Material und Methoden beschrieben.

Im Vergleich zu entsprechend verdünnten Nullseren zeigten alle getesteten Antiseren eine mindestens 10-fach höhere Bindung von ^{125}J-KAM Fab. Mäuse, die nur schwach positive Seren lieferten, wurden nicht für Fusionen eingesetzt.

Einige Mausantiseren wurden weiterhin mit der Methode der indirekten Immunfluoreszenz auf unfixierten Monolayer-Präparaten von 9d alten embryonalen Hühnerretinazellen untersucht. In Abb.4 sieht man das Bild, das sich bei 40-facher Verdünnung des Serums einer Maus ergibt, die mit Retinamembranen immunisiert worden war. Die Oberflächen aller Zellen sind gleichmäßig stark angefärbt. Zwischen den Seren verschiedener Mäuse finden sich in der Immunfluoreszenz keine Unterschiede, ebenso wie sich auch neuronale und nichtneuronale (z.B. Herz) Zellen in ihrer Färbung nicht wesentlich unterscheiden (nicht abgebildet).

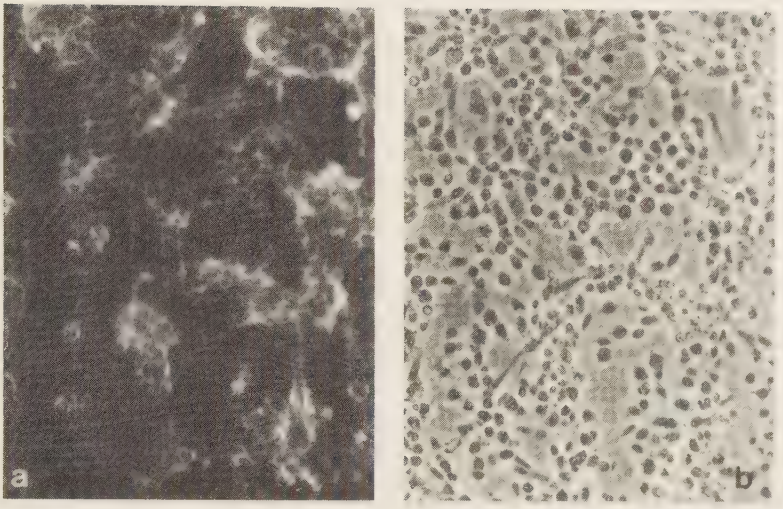


Abb.4 Indirekte Immunfluoreszenz mit Mausserum. Die Anfärbung wurde bei 40-facher Serumverdünnung an 9 Tage alten embryonalen Hühnerretinazellen durchgeführt, die über Nacht in Kultur gehalten worden waren. a) Immunfluoreszenz mit Mausserum Nr. 13 (immunisiert mit Retinamembranen), b) dasselbe Präparat im Phasenkontrast.

4.2.2. Ergebnisse auf der Ebene der Zellinien

Für die in Tabelle 1 angegebenen Fusionsexperimente wurden die Milzen von 10 Mäusen eingesetzt. Davon waren 2 Mäuse mit Retina-Einzelzellen immunisiert worden, 7 mit Retinamembranen und eine Maus mit Tectummembranen. Je nach Größe ihrer Milz wurden für jede Maus 2 oder 3 Zellhybridisierungen durchgeführt. Die Ausbeute an Hybridomen pro Fusion schwankte beträchtlich, wobei allerdings die Mäuse, die für die Fusionen mit dem schlechtesten Resultat (P und S) eingesetzt worden waren, besonders kleine Milzen aufwiesen. Im Durchschnitt wuchsen bei den erfolgreicheren Fusionen in 60% der ausgesäten Kulturen Zellen, die jedoch nach dem Transfer

aus den Mikrotiterplatten in Costar Tissue Culture Clusters nicht immer im Wachstum stabil gehalten oder durch Einfrieren konserviert werden konnten. Auch gelang es nicht, alle Zelllinien nach dem Auftauen zum Wachsen zu bringen, da einige zu einem Zeitpunkt eingefroren worden waren, an dem die Zellpopulation noch sehr heterogen und instabil gewesen war. Teilweise existierten von diesen Linien allerdings bereits Subklone, wenn Subklonierungen vor dem Einfrieren möglich gewesen waren. Eine nennenswerte Anzahl ging durch Infektionen verloren. Insgesamt wurden 1700 Kulturen in Mikrotiterplatten angesetzt, von denen 314 ≙ 18 % als stabile Zelllinien etabliert werden konnten.

Die Zellkulturüberstände aller etablierten Hybridome wurden radioimmunologisch getestet. Außerdem wurden bisher 213 Zellinienüberstände mit der Methode der indirekten Immunfluoreszenz auf unfixierten Einzelzellpräparaten von Retina- und/oder Tectumgewebe des 9 Tage alten Hühnerembryos untersucht. Die Ergebnisse dieser Tests zeigt Tabelle 2. Von 231 subklonierten Zellinien aus 17 Fusionsexperimenten waren 101 oder 44 % positiv im Radioimmuntest. Von den bisher mit der indirekten Immunfluoreszenz getesteten 213 Kulturüberständen zeigten 45 (21 %) eine reproduzierbare Anfärbung von Oberflächenstrukturen embryonaler Hühnerretina- oder -tectum-Einzelzellen. Eine größere Anzahl (61≙28.6 %) der Hybridom-Überstände ergab eine unbestimmte, meist schwächere Anfärbung von ausgelaufenem Zellmaterial oder von toten Zellen. Es wurden keine Überstände gefunden, die in der indirekten Immunfluoreszenz ein positives Ergebnis erzielten, aber mit dem Radioimmuntest nicht erfaßt worden waren.

Tabelle 2 Etablierung permanenter Zellinien aus Lymphocyten; Zusammenfassung

Fusions-bezeichn.	Anzahl d. Fusionen	Antigen	Gesamtzahl erhaltener Hybrid-Zellinien	Anzahl d. subklonierten Zellinien	Zahl d. im Radioimmuntest positiven subklonierten Zellinien	Zahl der in der indirekten Immunfluoreszenz positiven Zellinien; Oberflächenfluoreszenz[1]
P	2	Retinamembranen	1	-	-	-
Q	2	Retinamembranen	61	40	20	10 (22)
R	3	Retinamembranen	44	20	6	2 (7)
S	2	Retinamembranen	5	-	-	-
T	3	Retinamembranen	63	38	35	11 (44)
U[2]	3	Retinamembranen	20	17	7	4 (20)
V	2	Tectummembranen	120	116	33	18 (120)
Gesamt	17		314	231	101	45 (213)

1) Die Zahl in Klammern gibt die Anzahl der in der indirekten Immunfluoreszenz getesteten Zellinien der betreffenden Fusion an.

2) Fusion U wurde in 20 % Pferdeserum enthaltendem Medium durchgeführt.

Die Zellinien wurden, wie in 3.1.3.-3.1.6. beschrieben, etabliert. Im Radioimmuntest positive Zellinien zeigten im Vergleich mit Zellkulturmedium als Kontrolle eine mindestens 5-fach erhöhte Bindung von ^{125}J-KAM-Fab. Als positiv in der indirekten Immunfluoreszenz wurden solche Zellkulturüberstände bezeichnet, die eine reproduzierbare Anfärbung von Zelloberflächen zeigten. Dabei wurden unfixierte Präparate von embryonalen 9 Tage alten Hühnerretina- oder -tectumzellen verwendet, die über Nacht kultiviert worden waren.

Alle Zellinien, die sich in der indirekten Immunfluoreszenz als spezifisch gegen Oberflächenstrukturen gerichtete Antikörper-produzierende Zellen erwiesen hatten, wurden ein- oder zweimal in Mikrotiterplatten kloniert, um sicherzustellen, daß man Zellinien klonalen Ursprungs erhalten hatte und daß diese stabil waren im Hinblick auf ihre Fähigkeit, Antikörper zu synthetisieren. Weiterhin wurde ein Großteil anderer Linien bereits zu einem Zeitpunkt kloniert, an dem noch keine Ergebnisse aus den Immunfluoreszenztests vorlagen. Als monoklonale Antikörper werden im weiteren Antikörper bezeichnet, die von mindestens einmal klonierten Zellinien produziert werden, letztere werden Klone[2] genannt.

---

[2] Gegenwärtig existiert noch keine einheitliche, systematische Nomenklatur für Hybrid-Zellinien und die von ihnen synthetisierten Antikörper. In dieser Arbeit wird daher die folgende willkürliche Bezeichnung nach Saumweber et al. (1980) benutzt: Die anfängliche Hybridzellinie wird durch Buchstaben und die erste Zahl bezeichnet. Der Buchstabe gibt die Fusion an, aus der diese Linie stammt, die Zahl unterscheidet sie von allen übrigen aus derselben Fusion erhaltenen Linien. Nachfolgende Klonierungen sind durch Schrägstriche und eine weitere der Unterscheidung dienende Zahl gekennzeichnet.

Beispiel: Q211 / 7 / 12

Anfänglich selektierte Zellinie 211 der Fusion Q

Klon 7 dieser Zellinie nach dem ersten,

Klon 12 dieser klonierten Zellinie nach dem zweiten Klonierungsschritt

Bisher wurde keine Zellinie erhalten, die nach Klonierung in Mikrotiterplatten verschiedene Färbemuster zeigte. Es gab nur gleichartige positive oder negative Klone. Deshalb wurde der Antikörper jedes Zellklons nur durch die Bezeichnung der Zellinie mit dem Zusatz Ak (für Antikörper) versehen, z.B. Q211-AK. Für das entsprechende Antigen wird der Zusatz Ag verwendet. Sollte die ursprüngliche Zellinie nicht mehr existieren, so wurde die Klonbezeichnung anstelle der Zellinienbezeichnung gewählt (z.B. T61/3).

Tabelle 3 Immunfluoreszenz-Anfärbung in Monolayer-Kulturen von 9 Tage alten Hühnerembryonen

Klon	R E T I N A		T E C T U M		L U N G E		H E R Z	
	Unterschiede in der Färbeintensität der Zellen	Anteil d. gefärbten Zellen	Unterschiede in der Färbeintensität der Zellen	Anteil d. gefärbten Zellen	Endotheliale Zellen	Fibroblasten	Runde, nicht identifizierte Zellen	Muskel-Zellen
Q38	+	70	n.d.	n.d.	-	-	-	-
Q131	+	45		0	-	-		(+)
Q134	+	30	n.d.	n.d.		n.d.		n.d.
Q182	-	100	+	90		n.d.	-	+
Q205	-	40		n.d.		n.d.	-	-
Q211	+	10	+	80-90	-	-	-	-
Q393	+	50	+	95		+		+
T2	+	60	+	80-90	-	-	-	((+))
T14	+	30		n.d.	-	-		n.d.
T40	-	100		n.d.		+	+	(+)
T52	+	50	-	90	-	-	(+)	(+)
T61/3	+	40	+	30	-	-	-	-
T98	+	20		0		((+))	-	-
T109	+	90		n.d.		+		+
T327	+	95		n.d.	(+)	-	-	+
U8	+	95	+	80	(+)	-		((+))
U29	+	50		n.d.	+	-		((+))

U43	+	40	+	30-40	+	-		+
V7	-	0	+	80	+	+		n.d.
V15		25	+	90		((+))		((+))
V45		n.d.	+	80		n.d.	-	-
V49		n.d.	+	30-40		((+))		((+))
V126		n.d.	+	80-90	+	+		+
V138	-	20-25	+	30-40		(+)		((+))

Zusammenfassung des Färbeverhaltens von 24 monoklonalen Antikörpern in der indirekten Immunfluoreszenz. Getestet wurde auf unfixierten Einzelzellpräparaten. Die Symbole in den Spalten haben folgende Bedeutung:
+ oder - unter "Unterschiede in der Färbeintensität der Zellen" bedeutet Unterschiede vorhanden (+) oder nicht-vorhanden (-). In den Spalten Lunge und Herz zeigt ein +, daß die entsprechende Zelle gefärbt, ein -, daß die Zelle nicht gefärbt wurde. (+) heißt schwach, ((+)) sehr schwach oder sehr wenige Zellen angefärbt (unter 1 %). n.d. nicht durchgefünrt.

4.3. Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen embryonale Nervenzellen des Hühnerembryos

4.3.1. Nervensystemspezifität

Um die Frage zu beantworten, wie viele der erhaltenen monoklonalen Antikörper spezifisch Strukturen auf der Oberfläche von Nervenzellen erkennen, die nicht gleichzeitig auch auf nichtneuronalen Zellen exprimiert sind, wurden 89 verschiedene Klone parallel sowohl auf Retina- oder Tectum-Monolayerzellen als auch auf Lungen- und/oder Herz-Monolayerzellen in der indirekten Immunfluoreszenz untersucht. Herz- und Lungengewebe stellen in bezug auf ihre Zellzusammensetzung heterogene Gewebe dar; in primären Zellkulturen, die durch Trypsinbehandlung embryonaler Lungen hergestellt wurden, finden sich hauptsächlich Fibroblasten, aber auch etliche Zellen mit morphologisch epi- oder endothelialem Charakter. Herzgewebekulturen setzen sich überwiegend aus Myoblasten und Muskelzellen zusammen; vereinzelt sind jedoch auch kleine Nester oder Aggregate von runden Zellen zu sehen, die eventuell Zellen des spezifischen Reizleitungssystems darstellen. Wenn Färbung in diesen Kulturen gefunden wurde, erfolgte eine Beurteilung der gefärbten Zellen nach morphologischen Gesichtspunkten.

Eine Übersicht über die Ergebnisse ist in Tabelle 3 dargestellt. Es sind nur diejenigen Klone aufgeführt, die auf Nervengewebe eine deutlich positive Oberflächenfluoreszenz gezeigt hatten. Aus der Tabelle ist zum einen ersichtlich, welche Klone eine gewisse Spezifität für das Nervensystem aufweisen, d.h. nicht oder sehr schwach an Fibroblasten oder Herzmuskelzellen binden. Zum anderen kann ihr entnommen werden, wie groß der Anteil der gefärbten Zellen an der

jeweiligen Zellpopulation ist und ob Unterschiede in der Färbeintensität der Zellen bestehen.

Von den aufgelisteten 24 monoklonalen Antikörpern sind 13 insoweit spezifisch für das Nervensystem, als sie keine oder nur eine schwache bis sehr schwache Reaktion mit den untersuchten Zellen außerhalb des Nervensystems zeigen. Zu den letzteren gehören z.B. die Klone T2, U8 und V15, die an weniger als 1 % der Zellen aus Herz und/oder Lunge binden, oder der Klon V49, der zwar mit relativ vielen Zellen aus dieser Präparation reagiert, aber hier eine sehr viel weniger starke Färbung aufweist als an Zellen aus dem Nervensystem. Doppelimmunfluoreszenz-Untersuchungen, die zur Bestimmung der Zelltypspezifität (Neuron - Glia) der Antikörper vorgenommen wurden, erwiesen sich aus verschiedenen Gründen als nicht eindeutig. In der Diskussion wird dieses Problem noch weiter erläutert.

4.3.2. Monoklonale Antikörper mit Spezifität für Glykolipidantigene

Als Beispiel für eine Reihe verschiedener Antikörper sollen hier die Antikörper eines Klones beschrieben werden, bei dem es gelungen ist, die Moleküle zu charakterisieren, die von ihnen erkannt werden. Der Klon Q211/7/12 entstammt einer Fusion von P3-NS1/1-Ag4-1 Myelomzellen mit Splenocyten einer Maus, die mit Retinamembranen immunisiert worden war. Zellkultur-Überstände dieses Klons zeigten eine starke Bindung sowohl an unfixierte als auch an Formaldehyd-fixierte Retinazellen im Radioimmuntest, die mit 10-12.000 cpm ^{125}J-KAM Fab an 10^6 Zellen im oberen Bereich dessen war, was mit zahlreichen anderen Zellinien gemessen werden konnte.

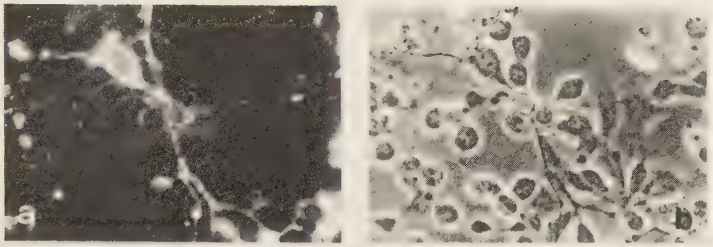


Abb.5 Q211-Ak Anfärbung von 9 Tage alten embryonalen Hühnerretinazellen. Die Zellen wurden durch Trypsinbehandlung dissoziiert und über Nacht in Kultur gehalten. Die Immunfluoreszenzanfärbung wurde an unfixierten Zellen durchgeführt. (a) Immunfluoreszenz, (b) dasselbe Präparat im Phasenkontrast.

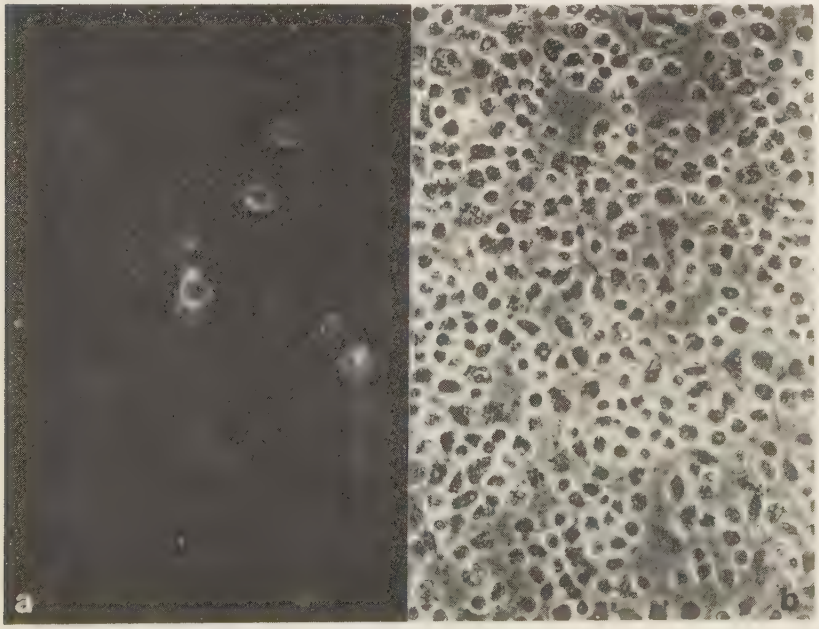


Abb.6 Q211-Ak Anfärbung von 8 Tage alten embryonalen Hühnerretinazellen. Das Gewebe wurde mit Papain dissoziiert und die Zellsuspension zwei Stunden auf Deckgläschen absitzen gelassen. Die Immunfluoreszenz wurde an unfixierten Zellen durchgeführt. (a) Immunfluoreszenz, (b) dasselbe Präparat im Phasenkontrast.

4.3.2.1. Nachweis des Q211-Ag in Zellkulturen

Immunfluoreszenz-Untersuchungen mit Q211-AK wurden an Einzelzellen aus verschiedenen Geweben und an Kryostat-Schnitten durchgeführt. Abbildung 5 zeigt ein mit Trypsin hergestelltes Einzelzellpräparat von 9d alten Hühnerretinae, bei dem die Zellen nach der Trypsinierung über Nacht anwachsen und ihre Oberflächenstrukturen regenerieren konnten. An ca. 10 % der Zellen ist eine deutliche Oberflächenfluoreszenz sowohl auf dem Zellsoma als auch auf Fortsätzen zu sehen. Ein Vergleich mit Zellen, die mit Papain dissoziiert worden waren und nur zwei Stunden an die Unterlage anheften konnten, zeigt keine wesentlichen Unterschiede, ein Hinweis darauf, daß es sich bei dem Q211-Ag um ein proteasestabiles Antigen handelt (Abb.6). Fixierung der Kulturen mit 1-4%igem Paraformaldehyd oder 1%igem Glutaraldehyd bewirkt keine Änderung in der Anfärbbarkeit der Zellen mit Q211-Ak, während fünfminütige Einwirkung von 96%igem Äthanol sie zerstört.

Abb.5 und 6 machen deutlich, daß der Q211-Ak sehr selektiv nur an eine Subpopulation von großen Neuronen bindet. Sie könnten Ganglienzellen darstellen (s. auch 4.3.2.3.), da diese innerhalb der Retinazellpopulation den größten Zelldurchmesser aufweisen. Aus Abb.5 ist weiterhin zu entnehmen, daß Untergrundzellen (Glia, Fibroblasten) nicht gefärbt werden.

Nicht nachweisbar ist das Q211-Ag auf Lungenfibroblasten und Herzmuskelzellen, stark gefärbt sind jedoch einige runde Zellen in der Herzpräparation. Die Spezifität des Q211-Ak für Nervengewebe ist nicht auf das zentrale Nervensystem be-

schränkt, da in Kultur gehaltene Hinterwurzelganglien von 9d alten Hühnerembryonen ebenfalls eine starke Fluoreszenz mit Q211-Ak zeigen (nicht abgebildet). Innerhalb des zentralen Nervensystems ist das Antigen auf Zellen verschiedener Gehirnteile zu finden, wie zum Beispiel im optischen Tectum und im Cerebellum (Abb.7), wo es auf 80 % bzw. 35 % der Zellen am Embryonaltag 12 exprimiert wird. Auf Grund der großen Anzahl gefärbter Zellen und ihrer starken Größenvariation erscheint es unmöglich, die Fluoreszenz bestimmten Neuronenklassen in der Cerebellumpräparation zuzuordnen.

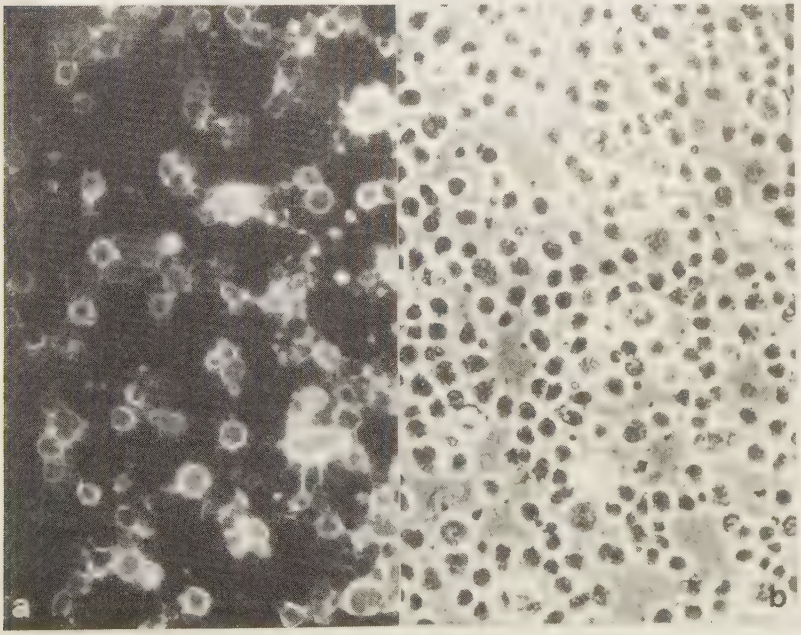


Abb.7 Anfärbung von 12 Tage alten embryonalen Hühnercerebellumzellen. Nach Dissoziierung des Gewebes mit Papain wurden die Zellen zwei Stunden auf Deckgläschen inkubiert und unfixiert für die Färbung verwendet. (a) Immunfluoreszenz, (b) dasselbe Präparat im Phasenkontrast.

4.3.2.2. Altersabhängigkeit der Q211-Ag-Nachweisbarkeit

Der früheste Zeitpunkt, an dem das Q211-Ag auf embryonalen Hühnerretinazellen nachgewiesen wurde, war Tag 4, jüngere Alter wurden nicht untersucht. 1 % der Zellen erscheint schwach positiv in der Immunfluoreszenz. Die Anzahl der gefärbten Zellen steigt im Lauf der Entwicklung an, über 4-5 % am Tag 6 auf ca. 10 % am Tag 9. Auch die Menge des Antigens pro Zelle nimmt während dieser Entwicklungsperiode zu. Dabei sind die Zellen innerhalb einer Population sehr unterschiedlich stark angefärbt. Ob der Prozentsatz der positiven Zellen im späteren Alter noch zunimmt, kann nicht eindeutig bestimmt werden, da Präparate von älteren Retinae meist einen erheblichen Anteil an toten Zellen und Debris aufweisen. Es erscheint jedoch, als ob nicht mehr gefärbte Zellen als am Tag 9 vorhanden wären.

4.3.2.3. Lokalisierung des Q211-Ag in Gefrierschnitten

Kryostat-Schnitte wurden von 5, 7, 9, 14 und 17 Tage alten Formaldehyd-fixierten Hühnerembryo-Retinae angefertigt, ebenso wie von 9 und 17 Tage alten Tecta. Am Tag 5 gibt es in der Retina noch keine Ausbildung von nukleären und plexiformen Schichten (Abb.8b), nur die vitreal gelegene optische Faserschicht ist im zentralen Bereich der Retina bereits vorhanden. Einzelne, deutlich markierte Zellen finden sich in der prospektiven Ganglienzellschicht (Abb.8a), insgesamt weist die Retina jedoch mit Ausnahme der optischen Faserschicht ein schwache Färbung auf. Am Embryonaltag 7 ist eine starke Zunahme der Fluoreszenzintensität im inneren Drittel der Retina mit besonderer Betonung der optischen Axonschicht zu verzeichnen (Abb.8c). Die fast vollständig

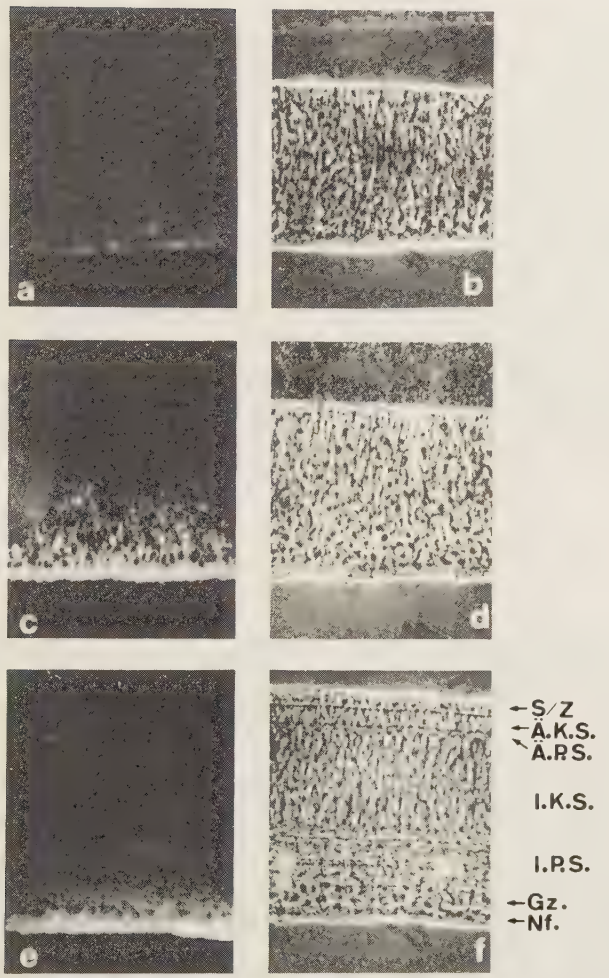


Abb.8 Lokalisierung des Q211-Ag in Retinaschnitten. Darstellung der Altersabhängigkeit der Antigenexpression. Die Immunfluoreszenz wurde an Paraformaldehyd-fixierten Kryostatschnitten embryonaler Hühnerretina verschiedenen Alters durchgeführt. a) 5 Tage alte Retina; c) 7 Tage alte Retina; e) 17 Tage alte Retina. b), d) und f) sind die entspechenden Phasenkontrastaufnahmen.
S/Z Stäbchen- und Zapfenschicht; Ä.K.S. Äußere Körnerschicht; Ä.P.S. Äußere plexiforme Schicht; I.K.S. Innere Körnerschicht; I.P.S. Innere plexiforme Schicht; Gz. Ganglienzellschicht; Nf. Nervenfaserschicht.

ausgebildete Retina am Embryonaltag 17 mit deutlich sichtbarer Schichtenstruktur erscheint relativ homogen gefärbt mit Ausnahme der Ganglienzellschicht und der optischen Faserschicht, die wiederum mehr Q211-Ak gebunden haben als die äußeren Schichten der Retina (Abb.8e).

4.3.2.4. Speziesspezifität des Q211-Ag

Das Q211-Ag ist nicht nur auf Zellen aus dem Nervensystem des Hühnchens beschränkt, sondern findet sich auch auf solchen, die aus Mäusen und Wachteln isoliert wurden. 2 Tage alten postnatalen Mäusen und 7 Tage alten Wachtelembryonen wurde die Retina entnommen und daraus Einzelzellpräparate hergestellt wie für Hühnerretinae (s.3.3.3.1.) beschrieben. In Suspension wurden diese Zellen direkt nach der Präparation für Immunfluoreszenz-Tests gefärbt. Die 7 Tage alten embryonalen Wachtelzellen, die vom Entwicklungszustand 8 Tage alten Hühnerretinazellen entsprechen, zeigen eine mit dem Hühnchen vergleichbare Färbungsintensität, auch der Prozentsatz der gefärbten Zellen ist in etwa gleich (Abb.9). Die Mauszellen sind deutlich schwächer gefärbt (Abb.10).

4.3.2.5. Biochemische Charakterisierung des Q211-Ag

In einer Reihe von Vorexperimenten konnte beobachtet werden, daß das Q211-Ag aus Retinamembranen mit einer Mischung aus Chloroform und Methanol extrahierbar war. 9 Tage alte Hühnerretinae oder -gehirne wurden mit Methanol/Chloroform/H_2O (2:1:0.3; v/v/v) versetzt und homogenisiert. Zwei zusätzliche Volumenteile Chloroform und 2 vol. H_2O wurden zugegeben, die untere Chloroformphase und die obere Methanol/H_2O-Phase wurden getrennt, eingetrocknet und

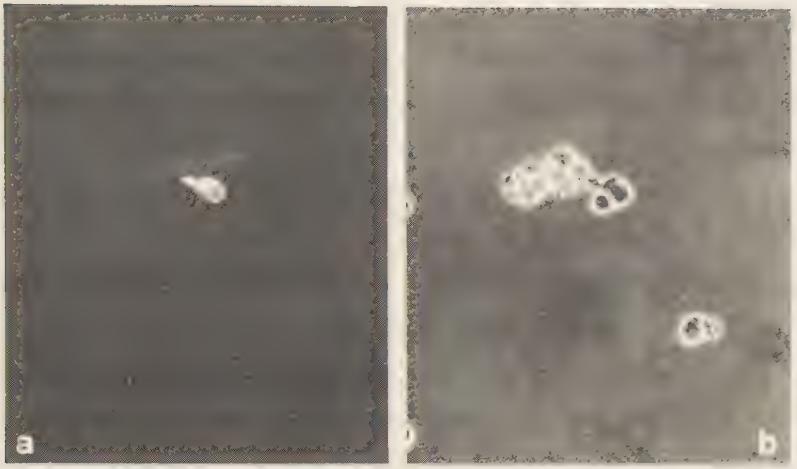


Abb.9 Q211-Ak Anfärbung von 7 Tage alten embryonalen Wachtelretinazellen. Die Retina wurde mit Papain dissoziiert, und die Zellen wurden direkt nach der Präparation gefärbt. a) Immunfluoreszenz, b) dasselbe Präparat im Phasenkontrast.

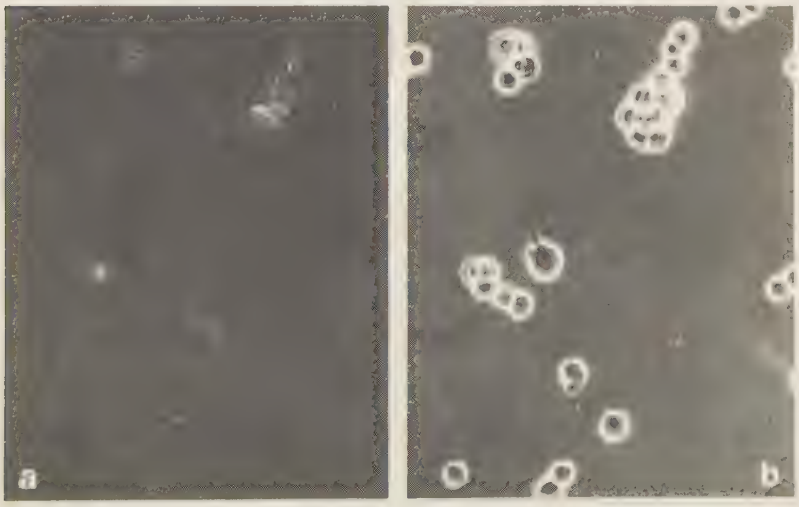


Abb.10 Q211-Ak Anfärbung von 2 Tage alten postnatalen Mausretinazellen. Nach Dissoziierung der Retina mit Papain wurden die Zellen direkt in Suspension gefärbt. a) Immunfluoreszenz, b) dasselbe Präparat im Phasenkontrast.

jeweils mit antikörperhaltigem Zellkulturüberstand inkubiert. Diese adsorbierten Überstände wurden dann zentrifugiert und für Immunfluoreszenzuntersuchungen an Retinazellen benutzt. Überstände, die zuvor mit dem Material inkubiert worden waren, das in die Methanol/H_2O-Phase überführt wird, zeigten keine Bindung mehr an Retinazellen. Das bedeutet, daß das Q211-Ag mit Methanol/H_2O aus Membranen extrahierbar ist und sich somit hinsichtlich seiner Löslichkeitseigenschaften ähnlich wie Ganglioside verhält. Nach Fraktionierung des Materials aus der Methanol/H_2O-Phase auf Kieselgel-Dünnschichtplatten in einem dualen Laufmittelsystem (s. Material und Methoden) war das Antigen in der Nähe der Auftragsstelle nachweisbar. Zur genaueren Charakterisierung

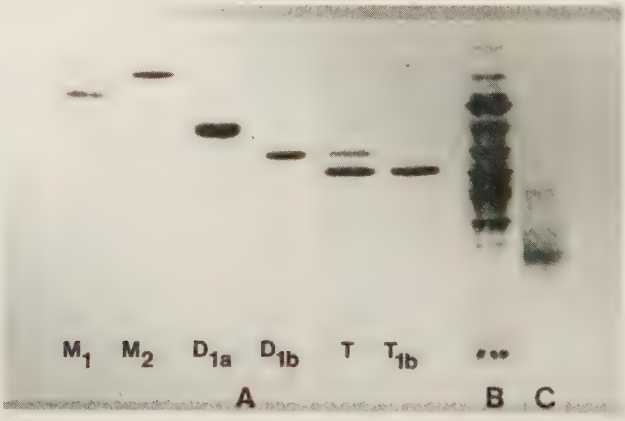


Abb.11 Identifizierung des Q211-Ag mit dem Antikörperbindungstest auf Dünnschichtchromatographieplatten. 5 µl Gangliosidextrakt aus 10 Tage alter embryonaler Hühnerretina (entsprechend 4µg Lipid-gebundener Neuraminsäure) wurden in einem dualen Laufmittelsystem auf HPTLC-Platten aufgetrennt. Nach Inkubation der Platte mit dem Kulturüberstand des Klons Q211/7/12 und ^{125}J-KAM-Fab-Antikörper wurde das Antigen autoradiographisch nachgewiesen (s.3.3.5.3). (A) Standardganglioside GM_1, GM_2, GD_{1a}, GD_{1b}, GT, GT_{1b}. (B) Anfärbung einer Vergleichs-Gangliosidprobe mit Resorcinol-HCl. (C) Autoradiographie eines Plattenteils nach Inkubation mit Q211-Ak.

wurden Ganglioside aus 9d-Retinae mit Tetrahydrofuran isoliert, auf HPTLC-Platten aufgetrennt und für den Antikörperbindungstest (s.3.3.5.3) eingesetzt. Ein Vergleich mit Standardgangliosiden ergab, daß der Q211-AK an Material mit den Laufeigenschaften von Tetrasialogangliosid (GQ_{1b} und GQ_{1c}) und höher sialisierten Gangliosiden bindet, die von Rösner (1980) als Pentasialoganglioside (GP_{1b} und GP_{1c}), Hexa- und Heptasialogangliosid beschrieben wurden (Abb.11).

Einstündige Inkubation des Extraktes mit Neuraminidase (SIGMA Typ VIII, Clostridium perfringens; 0.2 IE auf 20 µg Gangliosid-gebundene Neuraminsäure) bei Raumtemperatur in

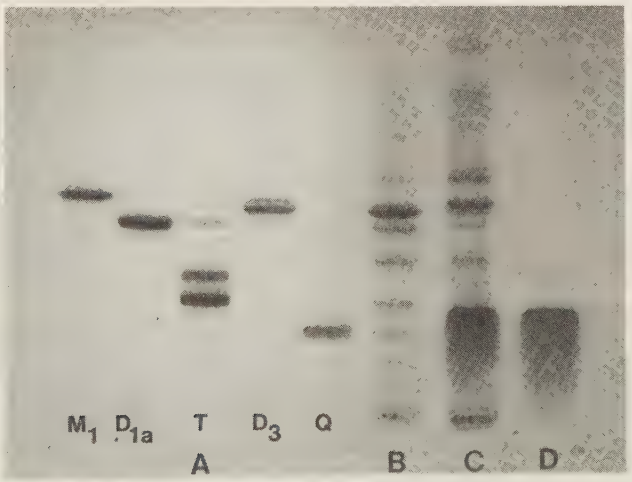


Abb.12 Dünnschichtchromatographie einer Gangliosidmischung aus 10d alter embryonaler Hühnerretina vor und nach Abbau durch Neuraminidase. 20µl Gangliosidgemisch, entspechend 20µg Lipid-gebundener Neuraminsäure, wurden 1 Std. bei Raumtemperatur mit 0.2 IE Neuraminidase verdaut. 4µl wurden auf HPTLC-Platten aufgetragen, ebenso wie 4µl unverdauten Gangliosidgemisches. Die Proben wurden in einem dualen Laufmittelsystem (s.3.3.5.2) zusammen mit Standardgangliosiden und N-Acetylneuraminsäure aufgetrennt. (A) Standardganglioside GM_1, GD_{1a}, GT, GD_3, GQ. (B) Gangliosidprobe. (C) Gangliosidprobe nach Neuraminidaseverdau. (D) N-Acetylneuraminsäure.

H_2O und anschließende Analyse auf HPTLC-Platten zeigt (Abb.12), daß der überwiegende Anteil der Retinaganglioside zu GM_1 und GM_2 abgebaut wird, wobei N-Acetylneuraminsäure frei wird. Ein Antigennachweis analog zu Abb.11c ist in Neuraminidase-verdauten Extrakten nicht mehr möglich, die antigene Struktur wird durch diese enzymatische Behandlung zerstört.

4.3.3. Antikörper mit funktionsinhibierender Wirkung

4.3.3.1. Charakterisierung des T61/3-Ak in der Immunfluoreszenz

Ebenfalls aus einer Fusion von mit Retinamembranen immunisierten Balb/c Splenocyten und P3-NS1/1-Ag4-1 Zellen wurde der Klon T61/3 etabliert, dessen Ursprungszellinie T61 nicht

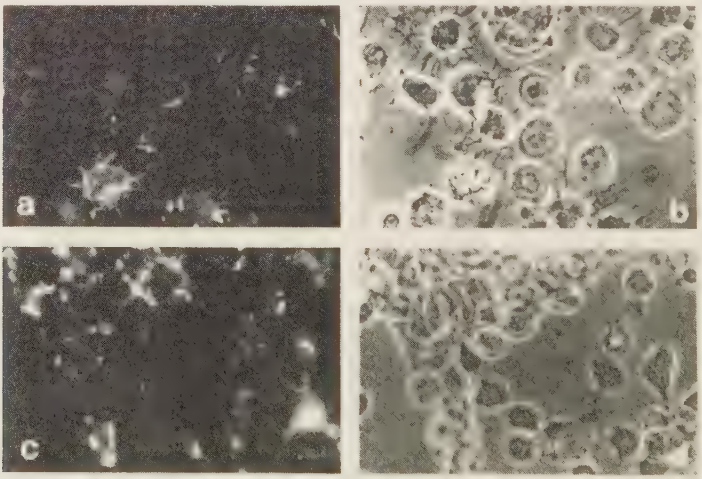


Abb.13 T61/3-Ak Anfärbung von embryonalen 9 Tage alten Retinazellen und 12 Tage alten Cerebellumzellen.
Hühnerretinae wurden mit Trypsin dissoziiert und die Zellen über Nacht kultiviert. Hühnercerebella wurden mit Papain dissoziiert und nur zwei Stunden auf Deckgläschen absitzen gelassen. Die Färbung wurde an unfixierten Zellen durchgeführt. a) Immunfluoreszenz an 12d Cerebellumzellen, b) dasselbe Präparat im Phasenkontrast, c) Immunfluoreszenz an 9d alten Retinazellen, d) dasselbe Präparat im Phasenkontrast.

stabil war. T61/3 produziert ein Immunglobulin der Subklasse IgG_3, das in seiner Spezifität gegen Oberflächenstrukturen auf Zellsoma und -fortsätzen von embryonalen Retina- und Gehirnzellen des Hühnchens gerichtet ist. Abb.13 zeigt Einzelzellpräparate von 12d Cerebella und 9d Retinae in der indirekten Immunfluoreszenz. Der Antikörper bindet an feinste cytoplasmatische Ausläufer der Zellen, wie am Beispiel der Cerebellumzellen zu sehen ist (Abb.13a), die noch keine Neuriten ausbilden konnten, da sie zwei Stunden nach der Präparation bereits gefärbt wurden. Läßt man Zellen über Nacht in Kultur anwachsen, so ist Fluoreszenz zusätzlich noch auf Zellausläufern zu lokalisieren (Abb.13c).

In Kryostat-Schnitten ist das Antigen sowohl auf unfixiertem als auch auf Paraformaldehyd-fixiertem Gewebe nachweisbar. Besonders stark konzentriert findet es sich in den plexiformen Schichten und der optischen Axonschicht. Die Laminierung der Retina im Lauf der Entwicklung ist mit dem T61/3-Ak gut zu zeigen, da die membranreichen Schichten der Zellfortsätze deutlich stärker als die nukleären Schichten angefärbt werden (Abb.14a-d).

Der T61/3-Ak ist spezifisch für das zentrale Nervensystem. Hinterwurzelganglien, sympathische Ganglien, Herz- und Lungenzellen erwiesen sich in der indirekten Immunfluoreszenz als negativ.

Das T61/3-Ag konnte bisher nicht identifiziert werden, sowohl die Analyse von Lipidextrakten als auch der Nachweis eines Protein-Antigens mit Proteintransfer-Methoden (Risau et al., 1981) ergab ein negatives Resultat. Die einzige Aussage, die über die Natur des Antigens gemacht werden

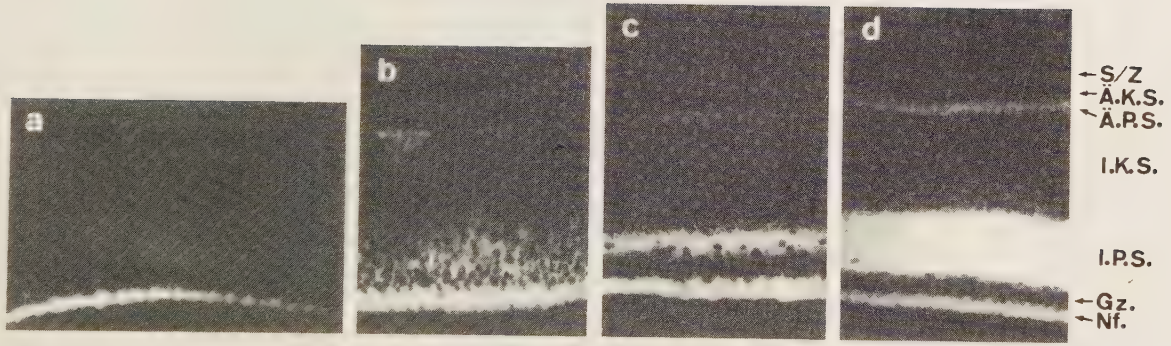


Abb.14 Lokalisierung des T61/3-Ag in Retinaschnitten. Darstellung der Antigenexpression in Abhängigkeit vom Entwicklungsalter. Die Immunfluoreszenz wurde an Paraformaldehyd-fixierten Kryostatschnitten embryonaler Hühnerretinae verschiedenen Alters durchgeführt. a) 5 Tage alte Retina, b) 7 Tage alte Retina, c) 9 Tage alte Retina, d) 17 Tage alte Retina. Die Abkürzungen entsprechen denen in Abb.8.

kann, betrifft ihre Stabilität gegenüber bestimmten Proteasen. Auf Zellen, die mit Trypsin oder Papain behandelt wurden,kann direkt nach der Präparation das T61/3-Ag in der indirekten Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. Dieser Befund deutet darauf hin, daß das Antigen in der membrangebundenen Form nicht von Trypsin und Papain angegriffen wird, schließt aber nicht aus, daß es trotzdem ein Protein oder Glykoprotein ist. So zerstört z.B. Pronase (R. Babiel, 1982) die Struktur des Moleküls, so daß es von T61/3-Ak nicht mehr erkannt wird.

4.3.3.2. Einfluß des T61/3-Ak auf das Auswachsen von Neuriten

Explantatkulturen, hergestellt aus 6d alten Retinae, zeigen ein lebhaftes Auswachsen von Fortsätzen, von denen nachgewiesen wurde, daß sie Ganglienzellaxonen entsprechen (Halfter et al., 1982). Nach Zugabe von T61/3-Ak-haltigem Zellkulturüberstand (1:1 gemischt mit Retinakulturmedium) konnte beobachtet werden, daß die Axone nur noch in geringer Zahl auswachsen. Kontrollen mit anderen, Antikörper-enthaltenden Überständen zeigten diesen Effekt nicht. T61/3-Ak-Ascites war voll aktiv bis zu einer Verdünnung von mindestens 1:30, entsprechend 15 µg IgG/ml Kulturmedium. In Abb.15 sind Explantate aus einer Retina zu sehen, deren Streifen (Herstellung s. 3.5.1.) abwechselnd in zwei Kulturschalen gelegt wurden, von denen eine mit Kontrollantikörper (W23) (Abb.15a) und eine mit T61/3-Ak (30 µg/ml) (Abb.15b) versetzt wurde. Nach 40 Stunden in Kultur wurden ehemals in der Retina benachbarte Streifen verglichen und photographiert. Das im Vergleich zur Abb.16a relativ geordnete und

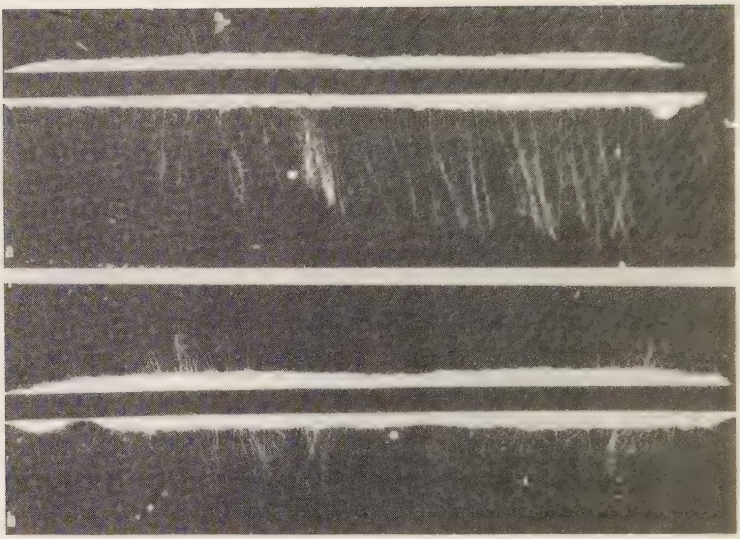


Abb.15 Einfluß des T61/3-Ak auf das Auswachsen von Ganglienzellaxonen im Vergleich mit Kontrollantikörpern. Streifen aus der 6 Tage alten embryonalen Hühnerretina wurden in mit Kollagen beschichteten Petriperm-Schalen explantiert (s.3.5.1). Nach zwei Stunden Adhäsion an das Substrat wurden 1.3 ml Kulturmedium, gemischt mit 30ug/ml Kontrollantikörper (W23) oder T61/3-Ak, hinzugefügt. Nach 40 Stunden in Kultur wurden die Explantate mit 1 % Paraformaldehyd fixiert und im Dunkelfeld betrachtet. Zwei ehemals benachbarte Streifen wurden verglichen und photographiert. a) Zeigt einen Streifen, der mit Kontrollantikörper (W23) inkubiert wurde; b) stellt den Nachbarstreifen dar, der mit T61/3 kultiviert wurde.

gebündelte Axonwachstum des Explantates in Abb.15a könnte auf einen unspezifischen Einfluß der Ascitesflüssigkeit zurückzuführen sein. Unter ungünstigen Kulturbedingungen ist eine solche Bündelung häufiger zu beobachten (W. Halfter, pers. Mitteilung).

Zeitrafferaufnahmen von bereits ausgewachsenen Ganglienzellaxonen auf Retinamonolayern zeigten, daß bei Zugabe von verdünnter T61/3-Ascitesflüssigkeit in derselben Konzentration

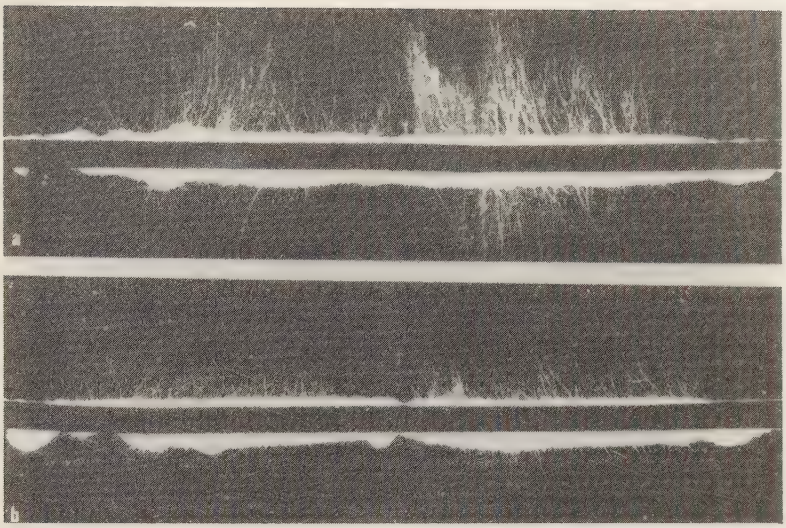


Abb.16 Inhibitorische Wirkung des T61/3-Ak in Explantatkulturen. Die Durchführung des Experiments erfolgte wie in der Legende zu Abb 15 und unter 3.5.1. beschrieben. Es wurde kein Kontrollantikörper verwendet. a) Kontrollstreifen, ohne Zugabe von Ak kultiviert. b) Ein Nachbarstreifen aus derselben Retina, in Gegenwart von T61/3-Ak ausgewachsen.

wie bei dem vorstehend beschriebenen Versuch ein sofortiges Sistieren des Axonwachstums auftritt. Die Wachstumskegel an den distalen Axonenden, die normalerweise Bewegungen auf dem Substrat ausführen, bleiben immobilisiert auf der Unterlage liegen, während ihre Filopodien (oder Microspikes) sich zum Teil noch im Medium bewegen. Abb.17 zeigt mehrere Wachstumskegel der Retinaneuriten mit fingerartigen Membranausstülpungen, den sogenannten Microspikes. In Abb.18 ist ein einzelner Wachstumskegel vergrößert in der Fluoreszenz abgebildet.

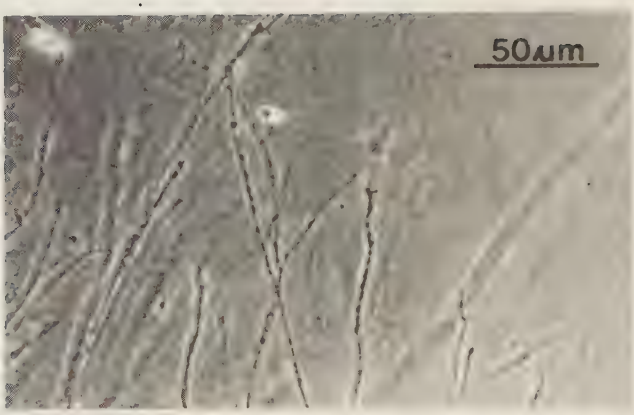


Abb.17 Retinaneuriten auf Kollagenschalen mit Wachstumskegeln und deren Microspikes

Abb.18 Wachstumskegel mit Microspikes in der Fluoreszenz. Die Retina wurde vor dem Explantieren mit dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodaminisothiocyanat vorgefärbt (s. 3.5.1.).

Die Wirkung des T61/3-Ak trifft nicht alle Axone, die aus solchen Explantaten auswachsen. Aus Abb.15b und 16b ist ersichtlich, daß eine Anzahl von ihnen noch auswachsen konnte, jedoch sind diese insgesamt bedeutend kürzer.

Wie groß der Anteil der nicht betroffenen Axone ist, kann lichtmikroskopisch nicht sicher bestimmt werden, da die Axone die Retina überwiegend gebündelt verlassen und die Zahl der Axone pro Bündel nur auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Bündelquerschnitten ausgezählt werden könnte. Die Beobachtung, daß ein Teil der Axone nicht auf die Zugabe von T61/3-Ak reagiert, konnte auch beim Betrachten der vorstehend beschriebenen Zeitrafferaufnahmen gemacht werden; diese Axone verfolgen die eingeschlagene Wachstumsrichtung weiter, während andere, wie bereits ausgeführt, auf der Stelle liegen bleiben. Da sich solche Verlaufsbeobachtungen im Rahmen dieser Arbeit nur schlecht darstellen lassen, wurde in Abb.19 der Versuch unternommen, den beschriebenen Sachverhalt photographisch zu dokumentieren. Wie bei den erwähnten Zeitrafferuntersuchungen wurden auch hier zwei Nachbarstreifen aus einer Retina zunächst 22 Stunden kultiviert, bevor 30 µg/ml Kontroll-Ak (W23) oder T61/3-Ak vorsichtig zugegeben wurden. Nach weiteren 24 Std. in Kultur wurden die Streifen photographiert. Abb.19a zeigt das Kontrollexplantat (W23), Abb.19b das mit T61/3-Ak inkubierte. Auf dieser Abbildung ist zu sehen, daß in der Nähe des Explantates Fortsätze in größerer Zahl vorhanden sind als weiter distal. Die Axone, die von der inhibierenden Wirkung des T61/3-Ak betroffen wurden, wuchsen nach der Zugabe des

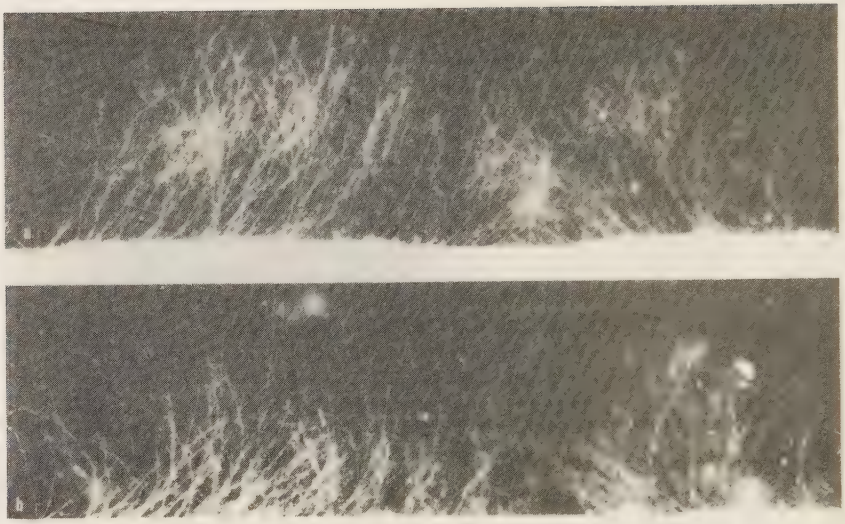


Abb.19 Inhibitorische Wirkung des T61/3-Ak auf bereits ausgewachsene Ganglienzellaxone. Retinastreifen wurden explantiert wie in der Legende zu Abb.15 und unter 3.5.1. beschrieben. Nach 22 Stunden in Kultur wurden 30ug/ml Kontrollantikörper (W23) oder T61/3-Ak hinzugefügt. Ehemals benachbarte Streifen aus einer Retina wurden dann nach weiteren 24 Stunden verglichen und photographiert. a) Kontrollstreifen mit W23-Ak; b)im Wachstum inhibierter Streifen, der mit T61/3-Ak inkubiert wurde.

Antikörpers nicht weiter und bewirken dadurch die höhere proximale Axondichte. Im Vergleich dazu weist der Kontrollstreifen (Abb.19a) eine relativ gleichmäßige Axondichte auf.

5. DISKUSSION

Spezifische Antikörper erwiesen sich seit längerer Zeit als nützliche Hilfsmittel bei der Untersuchung von entwicklungsbiologischen Fragestellungen. So wurde zum Beispiel über die Produktion von Antikörpern aus dem embryonalen Nervensystem des Hühnchens ein Faktor isoliert (Thiery et al., 1977), das sogenannte "cell adhesion molecule" (CAM), das nicht nur für die Adhäsion von retinalen und anderen neuronalen Zellen untereinander (Rutishauser et al., 1976), sondern auch für die Seit-zu-Seit-Kontakte von Neuriten, die bei ihrer Bündelung zu Faszikeln eine Rolle spielen (Rutishauser et al., 1978), verantwortlich sein soll, ebenso wie für die Interaktionen zwischen Nerven- und Muskelzellen (Grumet et al., 1982). Der Nachteil dieser spezifischen Antiseren besteht darin, daß man, um sie mit hohem Titer gewinnen zu können, ein sauberes Antigen in etwa Milligramm-Mengen zur Verfügung haben muß. Für Antigene, die nur in geringen Mengen in Zellmembranen vorkommen und bei denen das Ausgangsmaterial wegen des präparativen Aufwandes nur begrenzt zur Verfügung steht, wirft diese Anforderung größere Probleme auf.

Durch die Verwendung der von Köhler und Milstein (1975) entwickelten Methode zur Etablierung klonaler, Antikörper-produzierender Permanentkulturen erschien es möglich, diese Einschränkungen zu umgehen, da 1. Antigenmischungen zur Immunisierung verwendet werden können, weil im nachhinein dann die Klone ausgewählt werden, die Antikörper gegen das Antigen von Interesse produzieren, und 2. die Antigenmenge

kein Problem darstellt, da auf hohe Serumtiter gegen bestimmte Komponenten verzichtet werden kann. Allerdings bereitet das Auffinden eines Antikörper-produzierenden Klons gegen bestimmte seltenere Komponenten Schwierigkeiten und erfordert meist die Austestung vieler Klone aus mehreren Fusionsexperimenten.

Die vorliegenden Ergebnisse und die bereits in der Einleitung zitierten Arbeiten weisen auf die Leistungsfähigkeit dieser Methode hin. Inzwischen wurde von uns noch eine weit größere Anzahl von Klonen als die hier beschriebenen isoliert, die aber nicht Gegenstand dieser Arbeit sein sollen.

Antigendarstellung

Zur Herstellung des Antigens wurde eine Präparation gewählt, von der in in vitro-Tests (Halfter et al., 1981) gezeigt worden war, daß mit ihr Plasmamembranen gewonnen werden können, die zumindest einige der Eigenschaften aufweisen, die für die Erkennung zwischen retinalen Axonen und tectalen Zielzellen eine Rolle spielen könnten. Durch die Versuche von Kern-Veits (1981), die nachgewiesen hatte, daß diese Membranen ebenso wie lebende Zellen von Ganglienzellaxonen erkannt werden, sah sich unsere Hoffnung bestätigt, damit eine Antigenpräparation zur Verfügung zu haben, in der ein Großteil der Komponenten, die bei der Ausbildung der retino-tectalen Projektion des Hühnchens von Bedeutung sein könnten, in aktiver Form erhalten bleiben. Bei Membranpäparationen besteht an sich die Gefahr, daß im Verlauf der Aufarbeitung Bestandteile der Membranen durch unabsichtliche

Extraktion verlorengehen oder daß sie durch enzymatischen Abbau zerstört werden.

Mit ganzen Zellen als Antigen wurde überwiegend nicht gearbeitet, weil dann die Wahrscheinlichkeit, nicht erwünschte Antikörper gegen cytoplasmatische Faktoren oder Zellkernbestandteile zu erhalten, größer sein sollte als bei Membranpräparationen. Letztere stellen eine Anreicherung dar für die bei der Zellerkennung maßgeblichen Antigene. Die ersten Immunisierungen wurden allerdings mit Einzelzellen durchgeführt, da zu diesem Zeitpunkt noch keine Daten über die Güte der später verwendeten Membranen vorlagen.

Immunantwort

Sowohl die Retinazellen als auch die Retina- und Tectummembranen erwiesen sich nach den Ergebnissen des Radioimmuntests als deutlich immunogen. Die Seren der Mäuse, deren Milzzellen dann für Fusionen eingesetzt wurden, zeigten Immunantworten etwa gleicher Höhe. Der Antikörpertiter scheint jedoch kein eindeutiges Maß zu sein für die Stimulierung der Milz, da bei gleicher Immunantwort recht unterschiedliche Fusionseffizienzen (gerechnet als erhaltene Hybridome pro Milzzelle) erzielt wurden. Nach Stähli et al. (1980) kann der Stimulierungsgrad der Milz durch Größenanalyse der Milzzellen im Coulter Counter bestimmt werden. Ihre Befunde zeigen, daß die Anzahl positiver Hybridome abhängig ist vom Anteil großer Zellen (Blasten) in der Milzzellpopulation, die für die Fusion eingesetzt wurde. Für unsere Hybridisierungen wurden solche Analysen nicht durchgeführt. Aber auch bereits durch die Beurteilung der Milzgröße konnte

ein gewisser Hinweis auf ihre Verwendbarkeit erhalten werden, relativ kleine Organe mit niedrigen Zellausbeuten (unter $2x10^8$ Zellen) erwiesen sich als schlechtes Ausgangsmaterial.

Etablierung der Zellinien

Auf Grund der Erfahrung anderer Autoren (Saumweber, 1980) wurde als Zeitpunkt für die Zellhybridisierung Tag 3-4 nach der letzten Immunisierung gewählt. Zu dieser Zeit scheint in der Milz der Mäuse die Zahl der zur Fusion geeigneten Lymphocyten maximal zu sein (Claflin und Williams, 1978). Eine Reihe von Schritten bei der Fusion selbst ist kritisch für das Erreichen hoher Fusionseffizienzen, wie z.B. die Konzentration des PEG, Zusatz von DMSO zur Fusionsmischung und Zeitdauer der PEG-Inkubation. Diese Parameter waren bereits systematisch untersucht worden (Norwood et al., 1976; Davidson et al., 1976; Galfre et al., 1977) und hatten zu einer Abänderung der ursprünglichen Technik von Köhler und Milstein (1975) geführt. Wir benutzten zur Durchführung der Fusion ein Protokoll, das diese Modifikationen beinhaltet (Saumweber et al., 1980). Die endgültige Vorschrift ergab sich dann durch zusätzliche Veränderungen, die nach Fazekas de St.Groth und Scheidegger (1980) vorgenommen wurden. Als vorteilhaft stellte sich die Zugabe von Makrophagen zu den fusionierten Zellen heraus, eine viel größere Anzahl von Zellinien konnte dadurch zum Wachstum angeregt werden als in den Versuchen ohne Makrophagen. Die initiale Fusionseffizienz war davon nicht beeinflußt. Möglicherweise haben die Reste der im Selektionsmedium absterbenden Lymphocyten und

Myelomzellen einen direkten toxischen Effekt auf die anfänglich sehr kleinen Zellkolonien. Durch die Aktivität der Makrophagen, die diese Reste abräumen, könnte er verringert werden. Unsere Beobachtungen sind in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Fazekas de St.Groth und Scheidegger (1980), werden aber von anderen (Saumweber, pers.Mitt.) nicht geteilt.

Insgesamt wurden aus 1700 anfänglich angesetzten Kulturen 314 Zellinien etabliert, von denen 231 subkloniert wurden. Davon waren 44 % positiv im Radoimmuntest, jedoch zeigten nur 21 % der getesteten Zellinien-Überstände eine positive Immunfluoreszenz-Anfärbung von Oberflächen lebender Zellen. Für diese offensichtliche Diskrepanz bietet sich die folgende Erklärung als die wahrscheinlichste an: Der Radioimmuntest wurde im Gegensatz zur Immunfluoreszenz mit fixierten Zellen durchgeführt, weil die Zellen zwar relativ gut an die mit ConA vorbehandelten PVC-Platten oder die darin eingeklebten Glasplättchen anwachsen, aber im Verlauf der Inkubations- und Waschprozeduren sich vom Boden ablösen. Durch die Fixierung bleiben sie an der Platte angeheftet. Ausgeflossener Inhalt von toten Zellen wird mit an die Testplatte fixiert, und Antikörper gegen intrazelluläre Antigene wie Gerüststrukturen, cytoplasmatische Faktoren oder intrazelluläre Membranen können daran binden und werden mitbestimmt. Diese Erklärungsmöglichkeit wird unterstützt durch die Tatsache, daß in der Immunfluoreszenz 28 % der getesteten Hybridom-Überstände eine Anfärbung von ausgelaufenem Zellmaterial oder von toten Zellen zeigen. Insgesamt wären somit

49 % der untersuchten Kulturüberstände als sichtbar in der Immunfluoreszenz zu werten.

Den Radioimmuntest als einzigen Routinetest zu verwenden, erschien uns zu riskant, da die Gefahr bestand, daß fixierungsempfindliche Antigene übersehen würden. Außerdem war zu Beginn dieser Untersuchung nicht sicher, ob auch Antikörper, die nur sehr kleine Subpopulationen von Zellen erkennen, noch mit erfaßt würden. Die bisherigen Daten ergeben jedoch keinen Anhalt für diese Vorbehalte.

Ein Großteil der Zellinien, darunter besonders jene, die sich als positiv in der Immunfluoreszenz erwiesen hatten, wurden ein-bis zweimal kloniert; Hybridzellinien und Klone verlieren oft ihre Fähigkeit, Antikörper zu produzieren (Melchers et al., 1978). Obwohl dieses Phänomen nicht vollständig verstanden wird, dürfte ein Chromosomenverlust nach der Fusion und bei folgenden Zellteilungen dazu beitragen (Margulies et al., 1976; Melchers et al., 1978; Schall und Rechsteiner, 1978). Zweifache Klonierung in Mikrotiterplatten stellte in den meisten Fällen sicher, daß man klonale Zellinien erhalten hatte, die stabil waren im Hinblick auf ihre Fähigkeit, Antikörper zu erzeugen.

Monoklonale Antikörper mit Spezifität für das Nervensystem

Die 13 in Tabelle 3 aufgeführten monoklonalen Antikörper mit gewisser Spezifität für das Nervensystem stellen nur eine Mindestanzahl dar, da noch nicht alle Klone, die in der indirekten Immunfluoreszenz ein positives Ergebnis gezeigt hatten, auf nichtneuronalen Zellen angesehen wurden. Wie ausschließlich Zellen aus dem Nervensystem von diesen Anti-

körpern erkannt werden, muß noch untersucht werden; bisher wurden nur Herz und Lunge als nichtneuronale Gewebe in Immunfluoreszenz-Tests eingesetzt. Von polyklonalen Seren ist bekannt, daß Zellen aus dem Immunsystem immunologische Gemeinsamkeiten mit solchen aus dem Nervensystem aufweisen. So ist z.B. das Theta-Antigen, ein T-Zell-Antigen, auch auf Nervengewebe nachzuweisen (Reif und Allen, 1964). Ebenso finden sich Antigene mit einer verhältnismäßig hohen Spezifität für Neurone zusätzlich auf Spermien (NS-4, Schachner et al., 1975), auf Nierengewebe (NS-5; Zimmermann und Schachner, 1976) oder auf beiden (NS-6, exprimiert auf Neuronen und Glia; Chaffee und Schachner, 1977). Die meisten dieser Untersuchungen wurden an Mäusen durchgeführt, wie weit solche immunologischen Verwandtschaften auch bei Vögeln bestehen, ist nicht bekannt.

Die Spezifität von monoklonalen Antikörpern ist sehr viel höher als die von polyklonalen Seren. Es wurden Antikörper beschrieben, die zwischen peripherem und zentralem Nervensystem unterscheiden (Cohen und Selvendran, 1981; Vulliamy et al., 1981), Subpopulationen von Neuronen erkennen (Barnstable, 1980; Zipser und McKay, 1981; Lemmon und Gottlieb, 1982) oder zwischen verschiedenen Gliazelltypen differenzieren (Lagenaur et al., 1980). Eine gewisse Kreuzreaktion zwischn Nerven- und Immunsystem wurde kürzlich jedoch auch für einen monoklonalen Antikörper (UCHT1) gefunden, der bisher als Marker für menschliche T-Zellen benutzt wurde, aber innerhalb des zentralen Nervensystems exklusiv mit Purkinje-Zellen verschiedener Spezies reagiert (Garson et al., 1982).

Für die in dieser Arbeit vorgestellten monoklonalen Antikörper müßten ausführliche Untersuchungen hinsichtlich der Spezifität noch vorgenommen werden, wenn sie als Marker für Nervenzellen verwendet werden sollten. Wie aus Tabelle 3 ersichtlich ist, werden von vielen Antikörpern nicht alle Zellen aus der Retina oder aus dem Tectum angefärbt. Mehrere Möglichkeiten, um diesen Befund zu erklären, bieten sich an:

i) Da nicht alle Klone als Ascites gehalten wurden, könnte die Antikörperkonzentration in den Zellkulturüberständen, die für die Färbungen eingesetzt wurden, limitierend gewesen sein. Bei einer inhomogenen Antigenverteilung innerhalb der Zellpopulation würden dann eventuell Zellen, die nur wenig von dem entsprechenden Antigen auf der Oberfläche exprimieren, nicht mehr sichtbar angefärbt. Solche Beobachtungen konnten zum Teil tatsächlich gemacht werden, z.B. stieg der Anteil der V15-positiven Zellen an, als Ascitesflüssigkeit in verschiedenen Verdünnungen anstelle des Kulturüberstandes verwendet wurde. Bei einer Anzahl von Klonen wurde jedoch Ascitesflüssigkeit in den Immunfluoreszenztests eingesetzt (Q211, T61/3, U29, U43, U8, V15), und der in der Tabelle angegebene Prozentsatz gefärbter Zellen wurde bei Sättigungskonzentrationen des entsprechenden Antikörpers bestimmt.

ii) Die Antikörper unterscheiden zwischen Neuronen und Gliazellen. Um diese Vermutung abzusichern, müßten Doppelmarkierungsexperimente mit nerven- und gliazellspezifischen Antikörpern und den monoklonalen Antikörpern durchgeführt werden. Als gliaspezifischer Antikörper wird überwiegend α-GFAP (α-glial fibrillary acidic protein; Bignami et al., 1972)

verwendet, der an intermediäre Filamente in Astrozyten einer großen Anzahl von Spezies, unter anderem des Huhns (Dahl und Bignami, 1973) bindet. Für unsere Zwecke war dieser Antikörper nicht einzusetzen, da das GFA-Protein bei einigen Spezies (Schnitzer et al., 1981) erst spät in der Entwicklung auftritt und die embryonalen Hühnchenzellen in Kultur und in Schnitten nicht anfärbte. Ein anderer Antikörper, den wir benutzten, war ein monoklonaler α-Vimentin Antikörper (Falkner et al., 1981). Vimentin ist schon früh in Astrozyten nachzuweisen (Schnitzer et al., 1981), kommt aber auch in Fibroblasten und einer größeren Anzahl von anderen nichtneuronalen Zellen vor und ist somit nicht sehr spezifisch. Außerdem hat dieser Antikörper den Nachteil, zur Maus IgM-Klasse zu gehören wie etliche der hier beschriebenen monoklonalen Antikörper. Doppelimmunfluoreszenz war in diesen Fällen nicht möglich.

Aus histologischen Untersuchungen ergab sich kein Anhalt für eine Anfärbung von Müllerzellen, den Gliazellen der Retina, in der Art, wie sie von Barnstable (1980) beschrieben wurde. Für eine genaue Klassifizierung müßte die Doppelimmunfluoreszenz noch mit Neuronen-spezifischen Markern durchgeführt werden, die uns aber nicht zur Verfügung standen.

iii) Die Antikörper unterscheiden zwischen Neuronensubpopulationen. Die Schichten der Retina werden aus Ganglienzellen, Amacrin-, Bipolar- und Horizontalzellen aufgebaut sowie aus Photorezeptoren. Auf Grund ihrer typischen Lage können Rückschlüsse gezogen werden, welche Zellen gefärbt sind, wenn spezifische Färbemuster in Retinaschnitten gefunden

werden. Dieser Punkt wird im folgenden Abschnitt noch diskutiert werden.

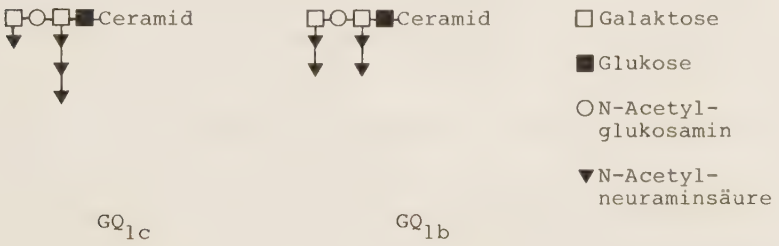
Monoklonale Antikörper mit Spezifität für Glykolipidantigene

Der Klon Q211/7/12 wurde für eine detailliertere Untersuchung ausgewählt, weil er in Immunfluoreszenz-Tests einige interessante Eigenschaften aufwies. Er färbte selektiv nur eine kleinere Subpopulation von großen Neuronen in der Retinazellpräparation, die nach der Lage, die sie in Retinaschnitten einnimmt, Ganglienzellen darstellen könnte. Weiterhin zeigte das Q211-Ag eine vom Entwicklungsalter abhängige Expression. Obwohl sehr frühe Stadien wegen präparativer Schwierigkeiten nicht untersucht wurden, könnte das Auftreten des Q211-Ag in etwa mit dem Auftauchen der ersten postmitotischen Zellen korreliert sein. Letztere finden sich am Embryonaltag 3 in der zentralen Region der Retina in der prospektiven Ganglienzellschicht (Kahn, 1973). In Einzelzellkulturen wurden Q211-positive Zellen am Tag 4 nachgewiesen, in Schnitten wurden diese ersten schwach positiven Zellen in der Ganglienzellschicht lokalisiert. Der Zeitverlauf der starken Zunahme von Q211-färbbaren Zellen zwischen Tag 4 und 8 entspricht in etwa dem Postmitotisch-werden der Hauptfraktion der Ganglienzellen (Tag 3-7; Kahn, 1973). Auch der Prozentsatz der positiven Zellen (8-10%) ist in Übereinstimmung mit der Anzahl der Ganglienzellen in der Gesamtpopulation ($2{,}5 \times 10^6$ in 4×10^7).

Daß der Q211-Ak insgesamt kein Ganglienzell-spezifischer Antikörper ist, wird aus Immunfluoreszenz-Untersuchungen an Einzelpräparaten aus anderen Gehirnregionen deutlich. Sowohl

im Cerebellum als auch im Tectum sind viele Q211-positive Zellen nachzuweisen. Welchen Zelltypen sie hier entsprechen, ist zur Zeit noch unklar, da Cerebellumschnitte nicht angefertigt wurden und in Tectumschnitten die Zuordnung wegen der wenig ausgeprägten Laminierung schwierig ist.

Die biochemische Charakterisierung des Antigens ergab, daß der Q211-Ak Ganglioside erkennt, die eine komplexe Grundstruktur wie GQ_{1b} und GQ_{1c} aufweisen. Dazu gehören alle Ganglioside, die soviele oder mehr N-Acetylneuraminsäuren als GQ (4) enthalten, von denen zwei in der 2-Stellung und mindestens eine in 4-Stellung am Tetraoserest gebunden sein müssen. Zwei Beispiele sollen der Veranschaulichung dienen:



GQ_{1c} GQ_{1b}

Diese Multisialoganglioside kommen mit Ausnahme von GQ im Gehirn von höheren Vertebraten nicht vor. Sie wurden bisher nur in Fischen (Hilbig und Rahmann, 1980) und in embryonalen Gehirnen von Vögeln nachgewiesen (Rösner, 1980). Damit in Übereinstimmung ist unser Befund, daß der Q211-Ak Retinazellen der Maus nur sehr schwach anfärbt, während Wachtel- und Hühnerretinazellen eine vergleichbare, starke Färbungsintensität in der Immunfluoreszenz aufweisen.

Die Funktion der Multisialoganglioside ist noch unbekannt. Da sie im Gehirn des Hühnchens im Verlauf der späteren Embryonalentwicklung wieder verschwinden, könnte ihnen

eine Bedeutung zukommen in der Entwicklungsphase der Differenzierung der Neuronen. Nach Rösner (pers. Mitteilung) bleibt das embryonale Gangliosidmuster im optischen Nerven erhalten, bis die Synaptogenese im Tectum stattfindet.

Aus in vitro-Experimenten mit Retinaexplantaten, die wir analog zu den für den T61/3-Ak beschriebenen durchführten, ergab sich kein eindeutiger Anhalt dafür, daß diese Multisialoganglioside beim Auswachsen von Neuriten eine wichtige Rolle spielen. Zumindest war kein starker inhibitorischer Effekt des Q211-Ak auf auswachsende Axone nachzuweisen. Roisen et al. (1981) berichten, daß Gangliosidmischungen axonales Auswachsen in Kulturen von Hinterwurzelganglien des Hühnchens oder in Kulturen einer bestimmten Neuroblastom-Zellinie induzieren. Ein ähnlicher Effekt des G_{M1}-Gangliosids wird von Purpura und Baker (1977) beschrieben, die bei einer Katzen-G_{M1}-Speicherkrankheit die Induktion von Neuriten beobachteten. Allerdings wird auch aus den aufgeführten Versuchen deutlich, daß nicht alle Zellinien in derselben Weise antworten. Es ist anzunehmen, daß verschiedene Neuronen unterschiedliche Anforderungen an das sie umgebende Medium hinsichtlich der Gangliosidzusammensetzung stellen.

Antikörper mit funktionsinhibierender Wirkung

Im Gegensatz zum Q211-Ak zeigt der T61-3-Ak eine deutliche inhibitorische Wirkung. Sowohl die Elongation von gerade ausgewachsenen Retinaaxonen als auch die von solchen, die bereits die Hälfte der Länge aufwiesen, die sie normalerweise unter den gewählten Kulturbedingungen erreichen, wurde stark gehemmt. Warum nicht alle Axone betroffen wurden, ist

noch eine ungeklärte Frage. Eine Möglichkeit wäre, daß sie Fortsätze von zwei voneinander verschiedenen Sorten von Ganglienzellen darstellen, von denen nur eine das Antigen exprimiert. Immunfluoreszenz-Untersuchungen an Explantaten sollten helfen, diese Erklärung auszuschließen oder zu bestätigen. Bisher waren die Ergebnisse aus entsprechenden Versuchen jedoch nicht eindeutig.

Weiterhin wäre denkbar, daß die Axone eine unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber der Konzentration des zugesetzten Antikörpers aufweisen. Da bisher mit Ascitesflüssigkeiten gearbeitet wurde, konnte die Menge des Antikörpers nicht beliebig gesteigert werden, ohne das Kulturmedium zu sehr zu verdünnen. Mit gereinigten IgG-Präparationen, die zur Zeit hergestellt werden, wird es möglich sein, die Konzentration noch weiter zu erhöhen. Auch in vivo-Untersuchungen über die Wirkung des T61/3-Ak können damit besser durchgeführt werden.

Hinsichtlich der Funktion des T61/3-Antigens können bisher nur Vermutungen geäußert werden, insbesondere, weil auch seine molekulare Struktur noch nicht bekannt ist. Die beobachteten Effekte sind erklärbar, wenn man annimmt, daß das T61/3-Ag den Rezeptor für einen im Medium vorhandenen Neuriten-induzierenden Wachstumsfaktor darstellt, vergleichbar dem NGF-Rezeptor (nerve growth factor; s. Übersichtsartikel Levi-Montalcini und Angeletti, 1968; Thoenen und Barde, 1980). Nach Besetzung des Rezeptors durch Antikörper kann der Wachstumsfaktor nicht mehr daran binden und verliert seine Wirksamkeit. Eine größere Anzahl von wachstumsfördernden Aktivitäten wurde bisher beschrieben, mit Ausnahme

des NGF und eines erst kürzlich isolierten Faktors aus dem Gehirn (Barde et al., 1982) aber nicht rein dargestellt. Beide zeigen ihre hauptsächliche Wirksamkeit im peripheren Nervensystem, obwohl letzterer eventuell auch einen Einfluß auf das Neuritenwachstum embryonaler Rattenretina ausübt. Über die Zellrezeptoren solcher Substanzen ist neben dem NGF-Rezeptor sehr wenig bekannt. Diskutiert wird in diesem Zusammenhang unter anderem auch eine Bedeutung der Gangliosside (Morgan und Seifert, 1979).

Eine ganz andere Erklärungsmöglichkeit, die uns wahrscheinlicher erscheint, geht von einer Störung des Kontaktes zwischen Wachstumskegel und unterliegendem Substrat durch den Antikörper aus. Nervenzellen benötigen eine geeignete Unterlage, um Neuriten ausbilden zu können, Zellen in Suspension senden keine Fortsätze aus. Die chemische Natur dieser Unterlage ist dabei von entscheidener Bedeutung, ob Auswachsen ermöglicht wird oder nicht. In Abhängigkeit von ihrer Herkunft zeigen Nervenzellen unterschiedliche Präferenzen für verschiedene Substrate. Zum Beispiel wachsen Axone aus Hinterwurzelganglien des Hühnchens besonders gut auf Poly-Lysin-beschichteten Kulturschalen aus. Explantate der embryonalen Hühnerretina bevorzugen natives Kollagen vor Poly-Lysin und Poly-Ornithin (Claviez, 1981). In einer Untersuchung von Letourneau (1975) über das Verhalten der Wachstumskegel von sensorischen Neuronen wird gezeigt, daß diese Poly-Ornithin und Gliazellen dem Kollagen als Substrat vorziehen. Aus diesen und vielen anderen hier nicht aufgeführten Beobachtungen wird geschlossen, daß sehr spezifische Wechselwirkungen zwischen den Wachstumskegeln an den Axon-

spitzen (das Axon selbst zeigt in vielen Fällen keine Adhäsion an die Unterlage) und dem Substrat stattfinden.

Die in den Ergebnissen beschriebenen Zeitrafferaufnahmen über das Verhalten der Wachstumskegel der Retinaaxone nach Zugabe von T61/3-Ak sprechen für einen direkten Einfluß des Antikörpers auf diese Interaktion. Bei einer Besetzung der Moleküle in der Membran, die für die Anheftung des Wachstumskegels von Bedeutung sind, wäre dann kein weiteres Wachstum möglich. Ungeklärt bleibt allerdings, warum das T61/3-Ag überall auf dem Axon und auch auf dem Zellkörper zu finden ist.

Der Befund, daß das T61/3-Ag in den bis jetzt untersuchten Geweben nur auf Zellen aus dem zentralen und nicht auf solchen aus dem peripheren Nervensystem nachzuweisen war, deutet auf eine sehr spezifische Funktion hin. Bisher wurde nicht geklärt, ob durch den T61/3-Ak auch Axone aus z.B. dem Tectum und dem Cerebellum in ihrem Wachstum inhibiert werden, da wir den Retinaexplantaten vergleichbare in vitro-Systeme damit noch nicht etabliert hatten. Möglich wäre, daß alle Axone aus dem ZNS von Vögeln gleichermaßen betroffen werden. Im weiteren wäre es wünschenswert, über gereinigte Antikörper und damit hergestellte Affinitätschromatographiesäulen das Antigen zu isolieren, um damit dann eventuell weiteren Aufschluß über seine Funktionsweise zu erhalten. Bisher wurden noch keine Substanzen genau charakterisiert, die das Wachstum von zentralen Axonen begünstigen oder hemmen. Der T61/3-Ak ist der erste beschriebene Antikörper, der einen deutlich sichtbaren Einfluß darauf ausübt.

6. Z U S A M M E N F A S S U N G

Ganze Zellen sowie Membranfraktionen aus Gewebe des optischen Systems von 9 Tage alten Hühnerembryonen wurden zur Immunisierung von Mäusen verwendet. Aus den Milzen dieser Tiere wurden nach der Methode von Köhler und Milstein (1975) 314 permanente Zellinien etabliert, von denen 231 subkloniert wurden. 101 dieser Klone sezernierten Antikörper, die, wie im Radioimmuntest gezeigt wurde, an Komponenten von fixierten Retina- oder Tectumzellen binden. Weniger als die Hälfte (45) der im Radioimmuntest positiven Antikörper erwiesen sich in der Immunfluoreszenz als gegen Oberflächenstrukturen lebender embryonaler Zellen gerichtete Antikörper. Bei 13 monoklonalen Antikörpern konnte eine gewisse Spezifität für das Nervensystem festgestellt werden. Zwei davon wurden ausgewählt und genauer charakterisiert. Es zeigte sich, daß ein Klon (Q211) an eine Klasse von Antigenen bindet, die als Multisialoganglioside identifiziert werden konnten. Sie sind als entwicklungsabhängige Antigene zu bezeichnen, da sie nur während einer bestimmten Entwicklungsperiode im embryonalen Nervensystem von Vögeln auftreten. Zellspezifität, Altersabhängigkeit und Speziesspezifität dieser Antigene wurde untersucht. Der andere Klon, T61/3, sezerniert einen Antikörper, der in besonderem Maße an die zellfortsatzreichen plexiformen Schichten der Retina bindet. Er erkennt ein Antigen, das - soweit untersucht - nur im zentralen Nervensystem exprimiert wird. Zugabe dieses Antikörpers zu Explantatkulturen embryonaler Hühnerretina führt zu einer starken Hemmung des Axonwachstums der Ganglienzellen.

7. L I T E R A T U R

1) Ando, S., Chang, N.-C, Yu, R.K.: High-performance thin-layer chromatography and densitometric determination of brain ganglioside compositions of several species. Anal. Biochem.89, 437-450 (1978)

2) Attardi, D.G., Sperry, R.W.: Preferential selection of central pathways by regenerating optic fibres. Exp.Neurol.7, 46-64 (1963)

3) Babiel, R.: Persönliche Mitteilung (1982)

4) Barbera, A.J.: Adhesive recognition between developing retinal cells and the optic tecta of the chick embryo. Dev.Biol. 46, 146-191 (1975)

5) Barbera, A.J., Marchase, R.B., Roth, S.: Adhesive recognition and retinotectal specificity. Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 70, 2482-2486 (1973)

6) Barde, Y.-A., Edgar, D., Thoenen, H.: Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. EMBO Journal 1, 549-553 (1982)

7) Barnstable, C.J.: Monoclonal antibodies which recognize different cell types in the rat retina. Nature 286, 231-235 (1980)

8) Barondes, S.H.(ed.): Neuronal Recognition, p.367. New York: Plenum Press (1976)

9) Bignami, A., Eng, L.F., Dahl, D., Uyeda, C.T.: Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence. Brain Res. 43, 429-435 (1972)

10) Bonhoeffer, F., Huf, J.: Recognition of cell types by axonal growth cones in vitro. Nature 288, 162-164 (1980)

11) Bonhoeffer, F., Huf, J.: In vitro experiments on axon guidance demonstrating an anterior-posterior gradient on the tectum. EMBO Journal 1, 427-431 (1982)

12) Bornstein, M.B.: Reconstituted rat-tail collagen used as substrate for tissue culture on coverslips in Maximow slides and roller tubes. Lab.Invest.7, 134-137 (1958)

13) Bradford, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal.Biochem.72, 248-254 (1976)

14) Bray, D.: Surface movements during the growth of single explanted neurons. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 65, 905-910 (1970)

15) Brunette, D.M., Till, J.E.: A rapid method for the isolation of L-cell surface membranes using an aqueous two-phase polymer system. J.Membrane Biol. 5, 215-224 (1971)

16) Chaffee, J.K., Schachner, M.: NS-6 (nervous system antigen-6): A new cell surface antigen of brain, kidney, and spermatozoa. Dev.Biol. 62, 173-184 (1978)

17) Claflin, L, Williams, K.: Mouse myeloma-spleen cell hybrids: enhanced hybridization frequencies and rapid screening procedures. In: Current Topics in Microbiology and Immunology 81, Lymphocyte Hybridomas (F.Melchers, M.Potter and N.L.Warner, eds.) pp.107-109. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag (1978)

18) Clarke, P.G.H., Whitteridge, D.: The projection of retina, including the "red area" on to the optic tectum of the pigeon. Quart.J.Exp.Physiol. 61, 351-358 (1976)

19) Claviez, M.: Kultur embryonaler Hühnchen-Retina: Eigenschaften auswachsender Neuriten und ihre Wechselwirkung mit der Umgebung. Inauguraldissertation Eberhard-Karls-Universität Tübingen (1981)

20) Cohen, J., Selvendran, S.Y.: A neuronal cell-surface antigen is found in the CNS but not in peripheral neurones. Nature 291, 421-423 (1981)

21) Cowan, W.M.: Aspects of neural development. In: Int.Rev. Physiol. Vol.17, Neurophysiology III (R. Porter, ed.) pp.149-191, Baltimore: University Park Press (1978)

22) Crossland, W.J., Cowan, W.M., Rogers, L.A., Kelly, J.P.: The specification of the retino-tectal projection in the chick. J.Comp.Neur. 155, 127-164 (1974)

23) Dahl, D., Bignami, A.: Immunochemical and immunofluorescence studies of the glial fibrillary acidic protein in vertebrates. Brain Res. 61, 279-293 (1973)

24) Davidson, R.L., O`Malley, K.A., Wheeler, T.B.: Polyethylene glycol-induced mammalian cell hybridization: Effect of polyethylene glycol molecular weight and concentration. Som.Cell Genetics 2, 271-280 (1976)

25) DeLong, G.R.: Histogenesis of fetal mouse isocortex and hippocampus in reaggregating cell cultures. Dev.Biol. 22, 563-583 (1970)

26) Dulbecco, R., Vogt, M.: Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. J.Exp.Med. 99, 167-182 (1954)

27) Eisenbarth, G.S., Walsh, F.S., Nirenberg, M.: Monoclonal antibody to a plasma membrane antigen of neurons. Proc.Natl.Acad. Sci. U.S.A. 76, 4913-4917 (1979)

28) Elsdale, T., Bard, J.: Collagen substrata for studies on cell behavior. J.Cell Biol. 54, 626-637 (1972)

29) Fahey, J.L.: Chromatographic separation of immunoglobulins. In: Methods in Immunology and Immunochemistry, Vol. I. (C. A. Williams and N.W. Chase, eds.) pp.321-332. New York: Academic Press (1967)

30) Falkner, F.-G., Saumweber, H., Biessmann, H.: Two Drosophila melanogaster proteins related to intermediate filament proteins of vertebrate cells. J.Cell Biol. 91, 175-183 (1981)

31) Fawcett, J.: Fibre organization in the optic nerve of Xenopus laevis. J.Physiol.306, 32P (1980)

32) Fazekas de St.Groth, S., Scheidegger, D.: Production of monoclonal antibodies: Strategy and tactics. J.Immunol. Meth. 35, 1-21 (1980)

33) Folch,J., Ascoli,I., Lees,M., Meath,J.A., LeBaron,F.N.: Preparation of lipid extracts from brain tissue. J. Biol. Chem. 191, 833-841 (1951)

34) Fujisawa, H., Watanabe, K., Tani, N., Ibata, Y.: Retinotopic analysis of fiber pathways in amphibians. II. The frog Rana nigromaculata. Brain Res.206, 21-26 (1981)

35) Galfre, G., Howe, S.C., Milstein, C., Butcher, G.W., Howard, J.C.: Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hybrid cell lines. Nature 266, 550-552 (1977)

36) Garson,J.A., Beverley,P.C.L., Coakham,H.B., Harper,E.I.: Monoclonal antibodies against human T lymphocytes label Purkinje neurones of many species. Nature 298, 375-377 (1982)

37) Gierer, A.: Development of projections between areas of the nervous system. Biol.Cybern. 42, 69-78 (1981)

38) Gottlieb, D.I., Arington, C.: Patterns of adhesive specificity in the developing central nervous system of the chick. Dev. Biol. 71, 260-273 (1979)

39) Gottlieb, D.I., Glaser, L.: A novel assay of neuronal cell adhesion. Biochem.Biophys. Res.Comm. 63, 815-821 (1975)

40) Gottlieb, D.I., Rock, K., Glaser, L.: A gradient of adhesive specificity in developing avian retina. Proc. Natl.Acad.Sci. U.S.A. 73, 410-414 (1976)

41) Greenwood, F.C., Hunter, W.M., Glover, J.S.: The preparation of ^{131}J-labelled human growth hormone of high specific radioactivity. Biochem.J. 89, 114-123 (1963)

42) Grumet, M., Rutishauser, U., Edelman, G.M.: Neural cell adhesion molecule is on embryonic muscle cells and mediates adhesion to nerve cells in vitro. Nature 295, 693-695 (1982)

43) Hämmerling, G.J.: T Lymphocyte tissue culture lines produced by cell hybridization. Eur. J. Immunol. 7, 743-746 (1977)

44) Halfter, W., Claviez, M., Schwarz, U.: Preferential adhesion of tectal membranes to anterior embryonic chick retina neurites. Nature 292, 67-70 (1981)

45) Halfter, W., Newgreen, D.F., Sauter, J., Schwarz, U.: Oriented axon outgrowth from avian embryonic retinae in culture. Dev.Biol., im Druck

46) Hamburger, V., Hamilton, H.L.: A series of normal stages in the development of the chick embryo. J.Morph.88, 49-92 (1951)

47) Hilbig, R., Rahmann, H.: Variability in brain gangliosides of fishes. J. Neurochem. 34, 236-240 (1980)

48) Hirn, M., Pierres, M., DeAgostini-Bazin, H., Hirsch, M., Goridis,C.: Monoclonal antibody against cell surface glycoprotein of neurons. Brain Res. 214, 433-439 (1981)

49) Holtfreter, J.: Gewebeaffinität, ein Mittel der embryonalen Formbildung. Arch. Exp. Zellforsch. 23, 169-209 (1939)

50) Horder, T.J., Martin, K.A.C.: Morphogenetics as an alternative to chemospecificity in the formation of nerve connections. Soc. Exp. Biol. Symp. 32, 275-358. Cambridge University Press (1978)

51) Horton, J.C., Greenwood, M.M., Hubel, D.H.: Non-retinotopic arrangement of fibres in cat optic nerve. Nature 282, 720-722 (1979)

52) Jacobson, M.: Studies in the organization of visual mechanisms in amphibians. Ph.D. thesis, Edinburgh University (1960)

53) Jacobson, M., Levine, R.L.: Plasticity in the adult frog brain: Filling the visual scotoma after excision or translocation of parts of the optic tectum. Brain Res. 88, 339-345 (1975)

54) Johnson, G.D., de C. Nogueira Araujo, G.M.: A simple method of reducing the fading of immunofluorescence during microscopy. J.Immunol.Meth. 43, 349-350 (1981)

55) Kahn, A.J.: Ganglion cell formation in the chick neural retina. Brain Res. 63, 285-290 (1973)

56) Kearney, J.F., Radbruch, A., Liesegang, B., Rajewsky, K.: A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreting hybrid cell lines. J.Immunol. 123, 1548-1550 (1979)

57) Kern-Veits, B.: Auswachsen von retinalen Axonen in vitro. Regionalspezifisches Erkennen von Zellmembranen durch retinale Axone in vitro. Biologische Diplomarbeit, Universität Hohenheim (1981)

58) Köhler, G. Howe, S.C., Milstein, C.: Fusion between immunoglobulin-secreting and nonsecreting myeloma cell lines. Eur. J. Immunol. 6, 292-295 (1976)

59) Köhler, G., Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 256, 495-497 (1975)

60) Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685 (1970)

61) Lagenaur, C., Sommer, I., Schachner, M.: Subclass of astroglia in mouse cerebellum recognized by monoclonal antibody. Dev.Biol.79, 367-378 (1980)

62) LaVail, J.H., LaVail, M.M.: The retrograde intraaxonal transport of horseradish peroxidase in the chick visual system: A light and electron microscopic study. J. Comp. Neur. 157, 303-358 (1974)

63) Lemmon, V., Gottlieb. D.I.: Monoclonal antibodies selective for the inner portion of the chick retina. J.Neurosc. 2, 531-535 (1982)

64) Letourneau, P.C.: Cell-to-substratum adhesion and guidance of axonal elongation. Dev. Biol. 44, 92-101 (1975)

65) Levi-Montalcini, R., Angeletti, P.U.: Nerve growth factor. Physiol.Rev. 48, 534-569 (1968)

66) Levine, R.L., Jacobson, M.: Deployment of optic nerve fibers is determined by positional markers in the frog`s tectum. Exp. Neurol. 43, 527-538 (1974)

67) Levinthal, F., Macagno, E., Levinthal, C.: Anatomy and development of identified cells in isogenic organisms. In: Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology, Vol.XL, pp. 321-331. Cold Spring Harbor Laboratory (1976)

68) Littlefield, J.W.: Selection of hybrids from matings of fibroblasts in vitro and their presumed recombinants. Science 145, 709-710 (1964)

69) Magnani, J.L., Brockhaus, M., Smith, D.F., Ginsburg, F., Blaszczyk, M., Mitchell, K.F., Steplewski, Z., Koprowski, H.: A monosialoganglioside is a monoclonal antibody-defined antigen of colon carcinoma. Science 212, 55-56 (1981)

70) Margulies, D.H., Knehl, W.M., Scharff, M.D.: Somatic cell hybridization of mouse myeloma cells. Cell 8, 405-415 (1976)

71) McGill, J.I., Powell, T.P.S., Cowan, W.M.: The retinal representation upon the optic tectum and isthmo-optic nucleus in the pigeon. J.Anat. 100, 5-33 (1966)

72) Melchers, F., Potter, M., Warner, N.L.: "Preface" In: Current Topics in Microbiology and Immunology 81, "Lymphocyte Hybridomas" (F.Melchers, M. Potter and N.L. Warner, eds), pp. IX-XVIII, Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag (1978)

73) Merrell, R., Gottlieb, D.I., Glaser, L.: Embryonal cell surface recognition. Extraction of an active plasma membrane component. J.Biol.Chem. 250, 5655-5659 (1975)

74) Morgan, J.I., Seifert, W.: Growth factors and gangliosides: A possible new perspective in neuronal growth control. J.Supramol. Struct. 10, 111-124 (1979)

75) Moscona, A.A.: Surface specification of embryonic cells: Lectin receptors, cell recognition, and specific cell ligands. In: The Cell Surface in Development (A.A. Moscona, ed.) pp. 67-99. New York, London, Sidney, Toronto: John Wiley & Sons (1974)

76) Norwood, T.H., Zeigler, C.J., Martin, G.M.: Dimethyl sulfoxide enhances polyethylene glycol-mediated somatic cell fusion. Som. Cell Genetics 2, 263-270 (1976)

77) Ouchterlony, Ö., Nilsson, L.Å.: Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. In: Handbook of Experimental Immunology. (D.M. Weir, ed.) Vol.1, Chapter 29, pp.19.1-19.44. Oxford: Blackwell Scientific Publications (1978)

78) Pontecorvo, G.: Production of mammalian somatic cell hybrids by means of polyethylene glycol treatment. Som. Cell Genetics 1, 397-400 (1975)

79) Purpura, D.P., Baker, H.J.: Neurite induction in mature cortical neurones in feline G_{M1}-ganglioside storage disease. Nature 266, 553-554 (1977)

80) Rager, G.: Die Ontogenese der retinotopen Organisation. Naturwissensch. 67, 280-287 (1980)

81) Rakic, P.: Kinetics of proliferation and latency between final cell division and onset of differentiation of cerebellar stellate and basket neurons. J. Comp. Neur. 147, 523-546 (1973)

82) Rakic, P.: Neurons in rhesus monkey visual cortex: Systematic relation between time of origin and eventual disposition. Science 183, 425-427 (1974)

83) Rakic, P.: Neuron-glia relationship during granule cell migration in developing cerebellar cortex. A Golgi and electron microscopic study in Macacus Rhesus. J.Comp. Neur. 141, 283-312 (1971)

84) Ranscht, B., Clapshaw, P.A., Seifert, W.: A monoclonal antibody against oligodendrocytes. Hoppe-Seyler`s Z.Physiol. Chem. 361, 13-27 (1980)

85) Reif, A.E., Allen, J.M.V.: The AKR thymic antigen and its distribution in leukemias and nervous tissues. J. Exp. Med. 120, 413-433 (1964)

86) Risau, W.: Verfahren zur Charakterisierung von Antigenen in einer komplexen Mischung. Diplomarbeit Eberhard-Karls-Universität Tübingen (1980).

87) Risau, W., Saumweber H., Symmons, P.: Monoclonal antibodies against a nuclear membrane protein of Drosophila. Exp. Cell Res. 133, 47-54 (1981)

88) Rösner, H.: A new thin-layer chromatographic approach for separation of multisialogangliosides. Anal.Biochem. 109, 437-442 (1980)

89) Roisen, F.J., Bartfeld, H., Nagele, R., Yorke, G.: Ganglioside stimulation of axonal sprouting in vitro. Science 214, 577-578 (1981)

90) Rutishauser, U., Gall, W.E., Edelman, G.M.: Adhesion among neural cells of the chick embryo. IV. Role of the cell surface molecule CAM in the formation of neurite bundles in cultures of spinal ganglia. J.Cell Biol. 79, 382-393 (1978)

91) Rutishauser, U., Thiery, J.-P., Brackenbury, R., Sela, B.-A., Edelman, G.M.: Mechanism of adhesion among cells from neural tissues of the chick embryo. Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 73, 577-581 (1976)

92) Sarthy, P.V., Lam, D.M.K.: Isolated cells from a mammalian retina. Brain Res. 176, 208-212 (1979)

93) Saumweber, H.: Monoklonale Antikörper gegen Kernproteine von Drosophila melanogaster. Inauguraldissertation Eberhard-Karls-Universität Tübingen (1980)

94) Saumweber, W., Symmons, P., Kabisch, R., Will, H., Bonhoeffer,F.: Monoclonal antibodies against chromosomal proteins of Drosophila melanogaster. Chromosoma (Berl.) 80, 253-275 (1980)

95) Scalia, F., Fite, K.: A retinotopic analysis of the central connections of the optic nerve in the frog. J. Comp. Neur. 158, 455-478 (1974)

96) Schachner, M., Wortham, K.A., Carter, L.D., Chaffee, J.K.: NS-4 (nervous system antigen-4), a cell surface antigen of developing and adult mouse brain and sperm. Dev. Biol. 44, 313-325 (1975)

97) Schall, D., Rechsteiner, M.: Kinetics of human chromosome loss from 3T3-human hybrid cells. Som. Cell Genetics 4, 661-676 (1978)

98) Schloßhauer, B.: Proteinmuster der embryonalen Retina des Huhns. Diplomarbeit Eberhard-Karls-Universität Tübingen (1981)

99) Schnitzer, J., Franke, W.W., Schachner, M.: Immunocytochemical demonstration of vimentin in astrocytes and ependymal cells of developing and adult mouse nervous system. J. Cell Biol. 90, 435-447 (1981)

100) Scholes, J.H.: Nerve fibre topography in the retinal projection to the tectum. Nature 278, 620-624 (1979)

101) Sharma, S.C., Gaze, M.M.: The retinotopic organization of visual responses from tectal reimplants in adult goldfish. Arch. Ital. Biol. 109, 357-366 (1971)

102) Sommer, I., Schachner, M.: Monoclonal antibodies (01 to 04) to oligodendrocyte cell surfaces: an immunocytological study in the central nervous system. Dev. Biol. 83, 311-327 (1981)

103) Sperry, R.W.: Visuomotor coordination in the newt (Triturus vivescens) after regeneration of the optic nerves. J. Comp. Neur. 79, 33-55 (1943)

104) Sperry, R.W.: Optic nerve regeneration with return of vision in anurans. J.Neurophysiol. 7, 57-69 (1944)

105) Sperry, R.W.: Neuronal specificity. In: Genetic Neurology (P.Weiss, ed.), pp. 232-239. Chicago: University of Chicago Press (1950)

106) Sperry, R.W.: Chemoaffinity in the orderly growth of nerve fiber patterns and connections. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 50, 703-710 (1963)

107) Sperry, R.W.: Embryogenesis of behavioral nerve nets. In: Organogenesis (R.L. DeHaan and H. Ursprung, eds.) pp. 161-186. New York, Chicago, Toronto: Holt, Rinehart & Winston (1965)

108) Stähli, C., Staehelin, T., Miggiano, V., Schmidt, J., Häring, P.: High frequencies of antigen-specific hybridomas: Dependence on immunization parameters and prediction by spleen cell analysis. J. Immunol. Meth. 32, 297-304 (1980)

109) Svennerholm, L.: Quantitative estimation of sialic acids. II. A colorimetric resorcinol-hydrochloric acid method. Biochim. Biophys. Acta. 24, 604-611 (1957)

110) Svennerholm, L.: Ganglioside designation. In: Advan.Exp. Med. Biol. 125, "Structure and function of gangliosides" (Svennerholm, L., Mandel, P., Dreyfus, H., and Urban, P.-F., eds.) p.11. New York und London: Plenum Press (1980)

111) Tettamanti, G., Bonali, F., Marchesini, S., Zambotti, V.: A new procedure for the extraction, purification and fractionation of brain gangliosides. Biochim. Biophys. Acta 296, 160-170 (1973)

112) Thanos, S.: Persönliche Mitteilung (1982)

113) Thiery, J.P., Brackenbury, R., Rutishauser, U., Edelman, G.M.: Adhesion among neural cells of the chick embryo. II. Purification and characterization of a cell adhesion molecule from neural retina. J. Biol. Chem. 252, 6841-6845 (1977)

114) Thoenen, H., Barde, Y.-A.: Physiology of nerve growth factor. Physiol. Rev. 60, 1284-1335 (1980)

115) Trisler, G.D., Schneider, M.D., Nirenberg, M.: A topographic gradient of molecules in retina can be used to identify neuron position. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 2145-2149 (1981)

116) van den Eijnden, D.H.: Chromatographic separation of gangliosides on precoated silicagel thin-layer plates. Hoppe-Seyler`s Z. Physiol. Chem. 352, 1601-1602 (1971)

117) Vulliamy, T., Rattray, S., Mirsky, R.: Cell-surface antigen distinguishes sensory and autonomic peripheral neurones from central neurones. Nature 291, 418-420 (1981)

118) Yoon, M.G.: Induction of compression in the re-established visual projections on to a rotated tectal reimplant that retains its original topographic polarity within the halved optic tectum of adult goldfish. J. Physiol. 264, 379-410 (1977)

119) Zimmermann, A., Schachner, M.: Nervous system antigen-5, an antigenic cell surface component of neuroectodermal origin. Brain Res. 115, 297-310 (1976)

120) Zipser, B., McKay, R.: Monoclonal antibodies distinguish identifiable neurones in the leech. Nature 289, 549-554 (1981)

D A N K

Allen Mitarbeitern, die mir durch Überlassung von Material oder durch Ratschläge beim Anfertigen dieser Arbeit geholfen haben, möchte ich herzlich danken. Herrn Dr. F.Bonhoeffer danke ich für seine großzügige Unterstützung, hilfreiche Kritik und Mithilfe bei technischen Problemen. Mein ganz besonderer Dank gilt Nevenka Podgornik für eine gute Zusammenarbeit und ihre Geduld bei der Zellkulturarbeit und den Fluoreszenztests, ebenso Horst Weber für die vielen Radioimmuntests und die Mitarbeit bei der Antigencharakterisierung. Pete Symmons unterstützte mich durch seine Diskussionsbereitschaft und die bereitwillige Weitergabe seines Wissens. Brigitte Kern-Veits überließ mir die Photos für die Abbildungen 1 und 2; Julita Huf, Willi Halfter und Peter Urban halfen bei Experimenten mit Retinaexplantaten. Nicht zuletzt möchte ich mich bei Frau Klara Ralinofsky für die Reinschrift des Manuskripts bedanken.

Lebenslauf

Am 21.12.1949 wurde ich, Sigrid Henke-Fahle, in Etelsen, Krs. Verden, als zweite Tochter der Eheleute Friedrich und Erika Henke geboren. Von 1956 bis 1960 besuchte ich die Volksschule in Achim und wechselte dann an das Gymnasium am Barkhof in Bremen, wo ich 1968 die Reifeprüfung ablegte.

Von 1968 bis 1971 studierte ich in Tübingen Biochemie und setzte nach dem Vordiplom das Studium an der Universität München fort. Im Sommer 1973 bestand ich in Tübingen die Diplom-Hauptprüfung in Biochemie. Anschließend begann ich im Herbst 1973 ein Studium der Humanmedizin an der Universität Hohenheim und fertigte gleichzeitig meine biochemische Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Virusforschung unter der Anleitung von Herrn Dr. Friedrich Bonhoeffer an. Nach zwei Semestern wechselte ich zum Wintersemester 1974/75 an die Universität Tübingen, wo ich im Sommer 1975 die ärztliche Vorprüfung ablegte. Am Max-Planck-Institut für Virusforschung begann ich zu der Zeit, an Fragestellungen zur Entwicklung des Nervensystems zu arbeiten. Den ersten Teil der ärztlichen Prüfung bestand ich im Sommer 1976, den zweiten Teil 1978. Nach der Ableistung des Praktischen Jahres an den Städtischen Krankenanstalten Eßlingen und der Abteilung für Kinder- und Jugendpsychiatrie in Tübingen schloß ich das Studium am 26.Oktober 1979 mit dem dritten Teil der ärztlichen Prüfung ab. Die vorliegende Arbeit wurde im Anschluß daran in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. F. Bonhoeffer am Max-Planck-Institut für Virusforschung angefertigt.

Seit dem 3.8.1979 bin ich mit Manfred Fahle verheiratet, unsere Tochter Nora wurde im Juni 1980 geboren.